

國立交通大學

生物醫學研究所

碩士論文

MTGFP 融合蛋白摺疊過程中分子內螢光
能量轉移研究

**Intramolecular Fluorescence Energy
Transfer Study of MTGFP fusion protein
during protein folding process**

研究生：姜芳馨

指導教授：張家靖

中華民國九十八年七月

MTGFP 融合蛋白摺疊過程中分子內螢光能量轉移研究
Intramolecular Fluorescence Energy Transfer Study of MTGFP fusion protein
during protein folding process

研究生：姜芳馨
指導教授：張家靖

Student:Fang-Hsing Chiang
Advisor : Chia-Ching Chang



碩士論文

A Thesis

Submitted to Institute of Biomedical Science

College of Biological Science and Technology

National Chiao Tung University

In partial Fulfillment of Requirement for the Degree of Master in Science

July 2009

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十八年七月

MTGFP 融合蛋白摺疊過程中分子內螢光能量轉移研究

學生：姜芳馨

指導教授：張家靖教授

國立交通大學生物醫學研究所 碩士班

摘要

為能即時觀測蛋白質摺疊的過程中做蛋白質摺疊狀態的變化，在這個研究中，我們設計 MTGFP (金屬硫蛋白融合綠色螢光蛋白) 蛋白質分子內的螢光共振能量系統(FRET)，可用來偵測金屬結合在金屬硫蛋白結合上。利用過臨界點摺疊路徑進行蛋白質的摺疊，發現 MT 蛋白質在摺疊過程中同時有 FRET 效應的產生。這是個新的技術利用螢光能量共振轉移做蛋白質摺疊的即時偵測。金屬硫蛋白具有 61 個胺基酸內有 20 個硫基，並具有 2 個金屬鍵結環。利用波長 395 nm 激發綠色螢光蛋白(GFP)，可在 508 nm 放出螢光，提供螢光環做為 FRET 的系統。利用準靜態熱平衡透析法(TED)摺疊 MTGFP 蛋白質，利用動態光散射儀(DLS)、圓二色光譜儀(CD)去證明蛋白質結構摺疊回自然態。利用感應耦合電漿原子發射光譜法 (ICP-AES)偵測到金屬離子已經摺疊到 MTGFP 蛋白質的內部，證明 MTGFP 具有結合金屬的能力。然而 MTGFP 蛋白質在摺疊過程中，508nm 螢光波長的強度逐步降低。發現 MT 可以做為一個淬熄子(quencher)會將 GFP 的螢光衰減掉。換句話說，MT 及 GFP 蛋白之間彼此有螢光共振能量轉移(FRET)現象也有淬熄(quenching)的現象。這是一個新的方式可以用來研究蛋白質摺疊的過程。

Intramolecular Fluorescence Resonance Energy Transfer Study of MTGFP fusion protein during protein folding process

Advisee: Fang-Hsing Chiang

Adviser: Dr. Chia-Ching Chang

Institute of Biomedical Science
National Chiao Tung University

Abstract

Protein folding status indicator is highly desired for revealing the folding process in real time. Therefore, ultra sensitive detection system in molecular scale is required. In this study, we designed an intramolecular fluorescence resonance energy transfer (FRET) system to monitor the folding status of metal binding protein, metallothionein (MT) by linking with green fluorescence protein (GFP). Both FRET and quench effect took place when the protein folding followed the over-critical reaction path. This new perspectives may provide significant strategy for investigation of protein folding process in real time. Metallothionein (MT) is a 61 amino-acids protein which contains 20 cysteine residues and forms two metal binding clusters (α -, β -domains). Green fluorescent protein (GFP), which emits green fluorescent light (λ max = 508 nm) by exciting with ultraviolet light (395 nm), can be used as a fluorophore in fluorescence resonance energy transfer (FRET) system. A fusion protein of MTGFP was cloned and refolded to native form by stepwise thermal equilibrium dialysis (TED). Both dynamic light scattering (DLS) and circular dichroism (CD) spectra indicate that the fusion protein has been refolded to its native state. The inductively couple plasma-mass (ICP-mass) spectrum also indicates that the refolded-MTGFP has restored its metal binding capability. However, the fluorescence intensity of MTGFP at 508 nm declines during the refolding process. Therefore the MT seems acting as a quencher of GFP when it folds to native state. Namely, there is intramolecular fluorescence energy transfer taking place between MT and GFP. This new perspectives may provide significant strategy for investigation of protein folding process.

誌謝

謝謝上帝讓我在三年前的颱風天來到張家靖老師這兒參加面試，感謝張老師給我機會使我能從您的助理變成學生，還有要謝謝老師三年來的教導，常給您製造意外的大小驚喜，而您總是很忍耐的給我重新學習的機會，尤其是當您在教我數學時，常常會大大的深呼吸，然後再繼續慢慢的教我時，真的很感謝老師…謝謝您！^_^=

感謝阿木學長（鄭博）謝謝您常常鼓勵我，每次都會跟我說：『很好、很好、這次比上次更好了。』，每當實驗結果不如預期時，您都叫我不害怕，阿木學長您就像爸爸一樣給我安定丸，尤其是口試那天站在台上緊張的傻了，可是您還是一直豎著大拇指，唸著不錯不錯的唇語，謝謝您！曾博謝謝您常幫我想辦法解決實驗的問題，也謝謝您跟我分享工作、家庭、休閒等等的看法，最常聽到您對我說：『不用功』，我會把您的教導記在心裡，遇到問題時會安靜思考解決的方法。在您一年的指導下獲益良多，謝謝您！謝謝師母在實驗上的協助；謝謝親愛的美儀姊姊在實驗及精神上的鼓勵；謝謝銘松學長幫我測量 ICP-AES，謝謝葉桑每天幫我們送信及整理環境，讓我們能專心的做實驗；謝謝阿亮爸爸這三年辛苦力，把你的脾氣越磨越好了；愛欺騙的人簡哥，謝謝你讓我提早瞭解社會真實面；突然當爸的建彰學長謝謝你在我念碩班製造的歡樂；無緣的辰哥謝謝你教我做實驗、看 paper、還有難過時安慰我；謝謝佩欣、昌祐、輔宣、姿亘對我的教導；謝謝可愛的小薇、阿良、靜怡、真宜、光凱學長、惠芳學姊、偉賢、昌翰、子歡、明勳、久安、秀敏，因為有你們大家才能讓整棟生科實驗二館充滿熱鬧的氣氛；終於輪到我的好朋友們-瑤貞我親愛的同居人，每天跟你一起作息真是幸福；靖淳無理頭搞的笑，讓實驗室每天都有充滿生氣；子正謝謝你的日出小吃，常幫我們加菜謝謝拉！感謝爸媽、阿姨們、教會的朋友們-惇方、家薇、佩熹及大學和五專的同學們，謝謝大家的鼓勵及常常為我禱告，給我很大的力量支持我前進；最後要感謝宏穆-我的寶貝小哥哥，交大三年的日子，不管我開心難過，你都在我身邊，幾乎每天不管多晚幾乎都護送我平安到宿舍，又常帶我去吃好料補身體，假日也常陪我在實驗室或教會渡過，有你在身邊，真幸福。

在張老師這的三年，讓我學到做研究應有的態度、解決問題的能力、合作團隊的重要，這三年的點點滴滴-酸、甜、苦、辣，要好好謝謝各位陪我一起成長，深深的謝謝大家-親愛的上帝、老師、曾博、鄭博、家人、情人、及實驗室所有的人，謝謝你們！

目錄

摘要.....	I
ABSTRACT.....	II
誌謝.....	III
目錄.....	IV
表目錄.....	VII
圖目錄.....	VIII
第一章 緒論.....	1
1-1 研究動機.....	1
1-2 螢光原理介紹.....	1
1-3 螢光共振能量轉移(FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER, FRET).....	2
1-4 淬熄效應 (QUENCHING).....	5
1-5 生物體發光.....	5
1-6 綠色螢光蛋白(GREEN FLUORESCENCE PROTEIN,GFP)介紹.....	6
1-7 金屬硫蛋白(METALLOTHIONEIN, MT)介紹.....	10
1-7.1 蛋白質結構與摺疊的重要性.....	12
1-7.2 蛋白質的變性 (denaturation) 與沈澱.....	12
1-7.3 蛋白質的復性 (renaturation) 與摺疊 (fold).....	13
第二章 實驗原理：.....	16
2-1 DNA 聚合酶連鎖反應 (POLYMERASE CHAIN REACTION,PCR).....	16
2-2 DNA 定序.....	16
2-3 誘導劑 IPTG.....	17
2-4 內涵體 (INCLUSION BODY).....	17
2-5 蛋白質變性與沈澱.....	18
2-6 各種常見的化學變性劑.....	18
2-7 蛋白質摺疊 (PROTEIN REFOLDING).....	20
2-8 圓二色光譜儀 (CIRCLULAR DICHRORISM, CD).....	22

2-9 動靜態光散射儀 (DYNAMIC LIGHT SCATTERING,DLS).....	23
2-10 螢光儀(FLUORESCENCE).....	23
2-10.1 螢光共振能量轉移(Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET).....	23
2-11 淬熄效應 (QUENCHING).....	25
2-12 感應耦合電漿原子發射光譜法 (INDUCTIVELY COUPLED PLASMA ATOMIC EMISSION SPECTROMETRY, ICP - AES)	26
2-13 腸激酶 (ENTEROKINASE , EK) 酵素切割	28
第三章 實驗方法.....	29
3-1 實驗材料的製備	29
3-1.1 重組蛋白質 pET200-MTGFP 及 pET200-MTekGFP 基因鑑定.....	29
3-2 蛋白質的小量表現與蛋白質的大量表現	30
3-3 蛋白質純化	30
3-3.1 破菌.....	30
3-3.2 Gel filtration.....	31
3-4 西方墨點法(WESTERN).....	31
3-5 蛋白質摺疊(PROTEIN FOLDING).....	32
3-6 圓二色光譜儀 (CIRCLULAR DICHROISM, CD).....	34
3-7 動態光散射儀 (DYNAMIC LIGHT SCATTERING,DLS).....	34
3-8 感應耦合電漿原子發射光譜法 (INDUCTIVELY COUPLED PLASMA ATOMIC EMISSION SPECTROMETRY, ICP - AES)	34
3-9 螢光光譜儀(FLUORESCENCE SPECTROSCOPY)	35
3-10 ENTEROKINASE 酵素切割.....	36
第四章 實驗結果.....	37
4-1 基因鑑定	37
4-1.1 重組蛋白質 pET200-MTGFP 及 pET200-MTekGFP 基因鑑定結果.....	37
4-2 MTGFP 重組蛋白質的表現.....	44
4-3 GEL FILTRATION 純化蛋白質	45
4-4 西方墨點法確認 MTGFP 蛋白質	48
4-5 圓二色光譜儀 (CIRCLULAR DICHROISM, CD)測量二級結構變化.....	49
4-6 動靜態光散射儀(DYNAMIC LIGHT SCATTERING,DLS)分析粒子大小.....	52
4-7 感應耦合電漿原子發射光譜法 (ICP - AES) 分析蛋白質內金屬含量.....	53

4-8 利用摺疊中間物探討蛋白質之穩定度及螢光螢光蛋白的表現	54
4-8.1 利用螢光儀分析 MTGFP 蛋白質其疏水性核心的形成	54
4-8.2 利用螢光儀分析 MTGFP 蛋白質觀察綠色螢光蛋白的表現	55
4-8.3 3D 全光譜尋找 MT 與 GFP 的螢光基團	58
4-8.4 MTGFP 蛋白質在摺疊過程中 FRET 的效應	60
4-8.5 螢光圖譜分析	62
第五章 討論	64
第六章 參考文獻	66



表目錄

表 1 突變 GFP 螢光蛋白種類.....	10
表 2 蛋白質變性的方法.....	13
表 3 減少蛋白質分子間錯誤鍵結的添加物.....	14
表 4 直接透析與階段性熱平衡透析法比較.....	15
表 5 階段性熱平衡透析法的變性藥劑和蛋白質摺疊緩衝液的化學成分.....	33
表 6 MTGFP 蛋白質各摺疊中間體的二機結構分佈表.....	50
表 7 ICP – AES 分析摺疊回自然態的 MTGFP 蛋白質金屬含量比例.....	53



圖目錄

圖 1 螢光能階示意圖	2
圖 2 螢光能量共振轉移 FRET 效應能階圖	3
圖 3 螢光能量共振轉移 FRET 與距離示意圖	4
圖 4 CFP 螢光蛋白及 YFP 螢光蛋白的 FRET 螢光光譜	5
圖 5 Aequorin 的發光機制示意圖	6
圖 6 GFP 的發光基團結構	8
圖 7 GFP 發光機團與其機制	9
圖 8 金屬硫蛋白(Metallothionein, MT)結構示意圖	11
圖 9 能量改變示意圖	22
圖 10 FRET 效應與距離的關係	24
圖 11 FRET 強度與距離的示意圖	25
圖 12 ICP-AES 架構原理圖	26
圖 13 感應耦合電漿激發源之構造示意圖	27
圖 14 MTekGFP 重組蛋白質內 enterokinase 的切點介紹	36
圖 15 pET200-MTGFP 及 pET200-MTekGFP 其 PCR 產物做 DNA 電泳分析 ..	38
圖 16 pET200-MTGFP 質體建構圖	39
圖 17 pET200-MTekGFP 質體建構圖	39
圖 18 MTGFP 之 SDS-PAGE 分析	44
圖 19 利用 Gel filtration 方式分離 MTekGFP 的蛋白質	45
圖 20 Gel filtration (Superdex 200 xk16/40) 分離 GFP 跑膠確認圖	46
圖 21 Gel filtration (Superdex 200 xk16/40) 分離 MTekGFP 所收集的樣品	46
圖 22 利用 Gel filtration 來第二次純化 MTekGFP 蛋白	47
圖 23 MTGFP Western 的結果	48
圖 24 MTGFP 蛋白質各摺疊中間體的 CD 光譜	50
圖 25 MTGFP 蛋白質各摺疊中間體的二機結構柱狀分佈圖	50
圖 26 MTGFP M5 與 GFP 與 MT 與 MTGFP 理想值的二級結構比較	51
圖 27 動態光散射儀分析 MTGFP 蛋白質在各摺疊過程中分子粒徑大小分佈 ..	52
圖 28 MTGFP 摺疊過程中(激發光 280 nm)各中間體的螢光光譜	54
圖 29 MTGFP 在摺疊過程中螢光光譜的位移分析(I320/I365)折線圖	55
圖 30 比較相同濃度下 GFP 與 MTGFP 其(激發光 395 nm)螢光表現	56
圖 31 MTGFP 摺疊過程中(激發光 395 nm)各中間體的螢光光譜	56

圖 32 MTGFP 摺疊過程中各中間體的螢光強度分佈圖(激發光 395 nm)	57
圖 33 MTGFP 摺疊過程中其摺疊中間體的螢光強度衰減圖 (激發光 395 nm)	57
圖 34 Commercial MT 3D 螢光立體光譜	58
圖 35 GFP 的 3D 螢光立體光譜	59
圖 36 MTGFP 摺疊過程中(激發光 350 nm) 各中間體螢光光譜分佈圖	60
圖 37 用 350 nm 激發觀察 MTGFP、GFP、MT 是否有 FRET 效應	61
圖 38 MTGFP 螢光扣掉 GFP 螢光後，分析 MT 在 440 nm 左右的螢光變化 ..	62
圖 39 Native page 觀察 Enterokinas 切割 MTeKGF 的結果.....	63
圖 40 用 Enterokinas 切割 MTeKGF 後，用軟體去分析其螢光強度變化.....	63



第一章 緒論

1-1 研究動機

蛋白質、去氧核糖核酸、生物膜皆屬於生物巨分子，這些巨分子具有自我組織 (Self-organization) 形成穩定結構的能力，當生物巨分子處在開放系統的環境中，其系統內部的分子會與外在環境產生交互作用，而改變構形，使分子趨於能量最低態的特殊構形[1,2]。

金屬硫蛋白 (Metallothionein, MT) 具有 α -、 β - 兩個金屬鍵結團簇 (metal cluster/domain)[3-7]。2006 年研究指出，螯合金屬後的 MT，其 α -、 β - metal cluster 形狀類似兩個環狀結構，當 β -metal cluster 形成 $(\text{Mn}_2\text{CdS}_3)^{3-}$ 時，可形成磁矩；而 α -metal cluster 雖沒有磁性卻扮演穩定 β -metal cluster 的角色[8]。然而這環狀結構上的金屬原子具有自由電子，且這些自由電子會在金屬原子上自由跳動，類似於電子共振的現象[8]，所以我們推測 metal cluster 可能會吸收能量放出螢光或影響其他發光機團的發光效應。

生物冷光 (Bioluminescence) 是在大自然中生物所發出的光之總稱，而本實驗中主要是探討綠色螢光蛋白 GFP (Green Fluorescence protein)，而此蛋白質是 1962 年從水母細胞中被發現，且使用 395 及 475 nm 的光激發後，會在 508 及 503 nm 呈現螢光[9,10]。

螢光蛋白在生物技術上有許多貢獻，例如用螢光蛋白做為指標，分析蛋白質摺疊狀況的指標[11,12]，以及藉由螢光共振能量轉移 (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) 的效應快速檢測蛋白質在摺疊過程中能量的變化[13-15]。

然而在掃描 MT 及 GFP 蛋白質螢光光譜時，發現其 MT 的放射光譜與 GFP 的螢光激發波長的位置很接近，根據螢光共振能量轉移 (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) 理論(圖 2) [16]，推測 MT 及 GFP 蛋白之間可能會有 FRET 現象，於是我們合成金屬硫蛋白融合綠色螢光蛋白 (Fusion protein of Metallothionein and green fluorescence protein, MTGFP) 做為實驗材料。觀察及探討 MTGFP 蛋白質在摺疊過程越接近自然態 (native state) 時，MT 及 GFP 兩蛋白質分子間距離越接近，是否 GFP 產生的螢光能量會有轉移的現象。

1-2 螢光原理介紹

螢光物質受到特定能量的光源激發後，可以產生高或低於原本能量光源的光的物質。在平常的狀況下，這些螢光物質的電子大多會處於最低能量的狀態，稱為基態。當分子吸收了與它的特徵頻率一致的特定光源時，其電子便由基態躍遷至能量

較高的激發態（此激發態又依能量的高低區分為各階的激發態）。經過一段時間，處於不同能階激發態的電子會降至最低能量的激發態，在這一過程中所消耗的能量，並不以光的形式釋放，這是因為這些螢光分子會和周圍的同類分子或其他分子經歷震動鬆弛 (vibrational relaxation) 將能量散失掉。當降至較低能量激發態的電子又下降至基態時，此時會以光的形式釋放出多餘的能量，所產生的光即是螢光(圖 1)。

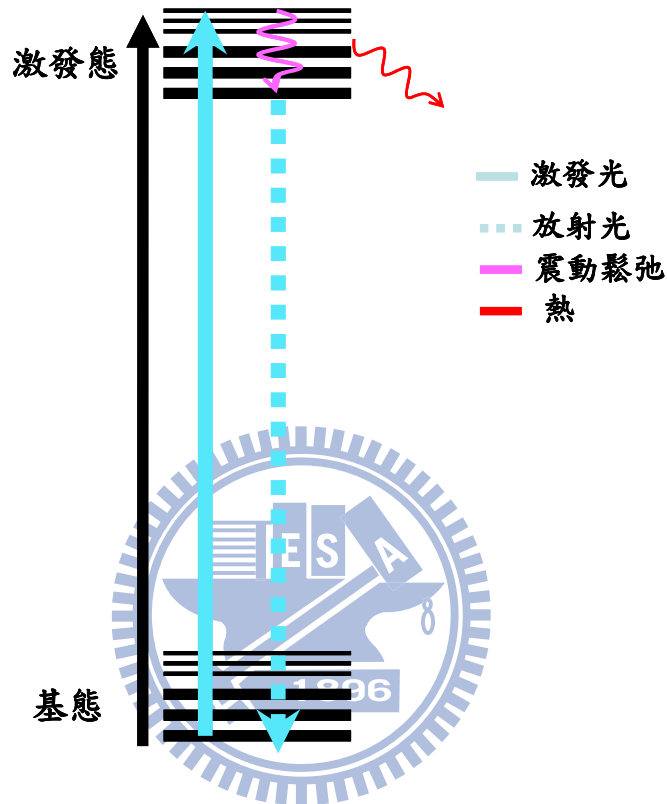


圖 1 螢光能階示意圖

分子受到激發光刺激，由基態上升到激發態，因為電子處於激發態時能量較高且不穩定，所以分子間會產生震動鬆弛(Vibrational relaxation)會先以熱的形式釋放能量，最後以螢光的形式放出能量，回到能量最低的基態。

1-3 螢光共振能量轉移(Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET)

廣義的來說，FRET 指的是有螢光能量的改變造成螢光共振能量的轉移。但一般而言，FRET 較常用來探討兩螢光分子間的作用因距離的關係，使被激發的螢光基團(能量提供者, Donor, D) 能量在回到基態所放出的能量被轉移到鄰近的螢光基團(能量接受者, Acceptor, A)的現象(圖 2、圖 3)。FRET 發生的主要條件：1. Donor (D) 和 Acceptor (A)之間必須相互靠近小於 100 \AA [17]2.Acceptor(A)的激發(Excitation,Ex)光譜與 Donor(D) 螢光放射(Emission, Em)光譜必須有重疊(圖 4)。3.Donor(D)和 Acceptor(A)躍遷偶極方向(transition dipole orientations)並非垂直[14,18]。在本研究中將 MT 當作 donor，而 GFP 當作 Acceptor，倘若有 FRET 的現象產生時，會發生在蛋

白質結構接近自然態的狀況下，使兩分子的距離彼此接近，並推測此時 GFP 的螢光能量可能會增加。

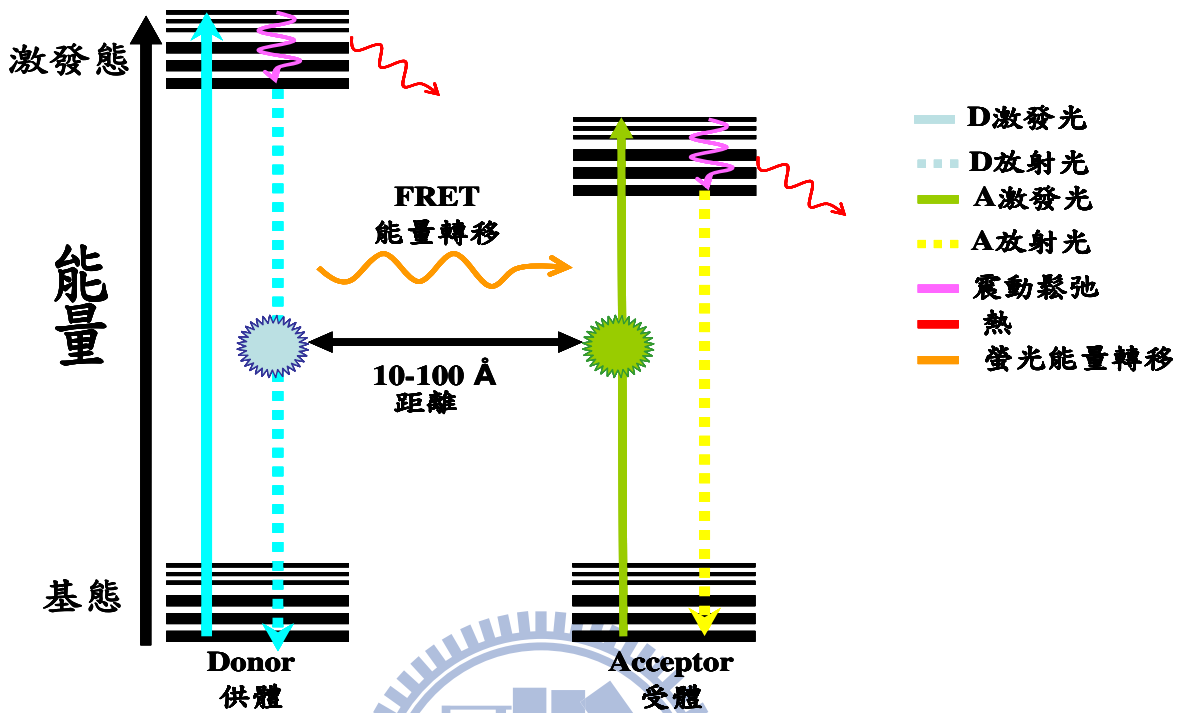


圖 2 螢光能量共振轉移 FRET 效應能階圖

Donner 受到激發光激發的 donor，能量會由基態上升到激發態，因為電子處於激發態時能量較高且不穩定，所以分子間會產生震動鬆弛 (Vibrational relaxation) 會先以熱的形式釋放能量，最後以螢光的形式放出能量，回到能量最低的基態。FRET 效應發生在 Donor 與 Acceptor 兩螢光分子距離範圍約 10~100 Å 時，Donor 釋放的能量不會以螢光的方式釋出，而是轉移能量給 Acceptor，造成 Donor 螢光能量減弱而 Acceptor 螢光能量增加。

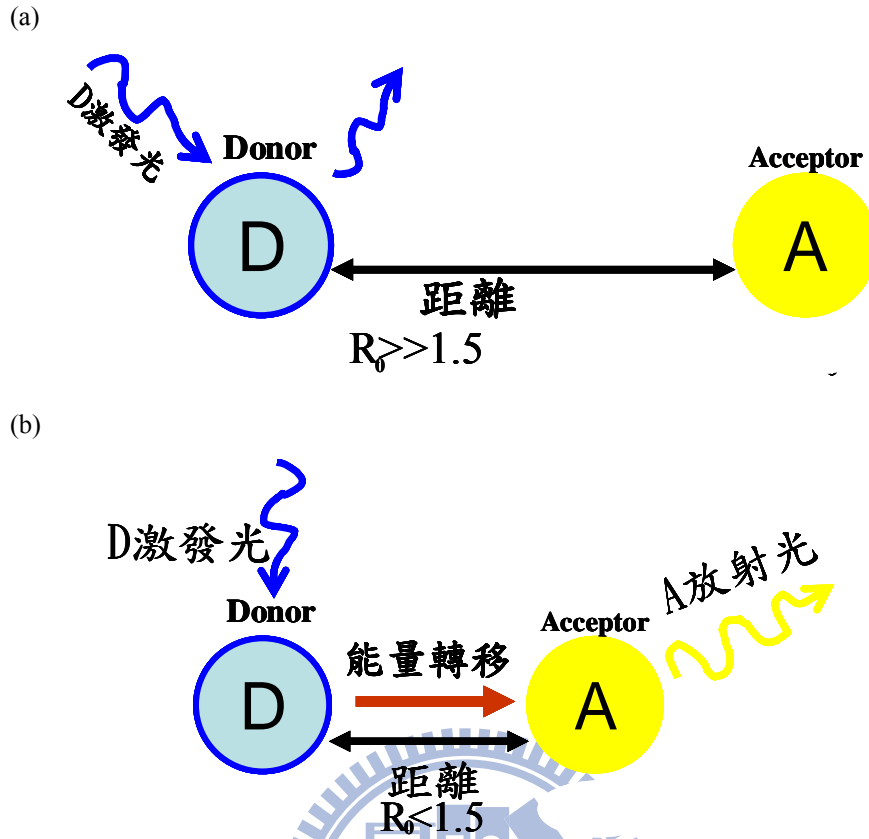


圖 3 螢光能量共振轉移 FRET 與距離示意圖

FRET 現象的發生與兩螢光分子基團的距離是有強烈相關性。D: Donor ; A: Acceptor。R: 兩螢光分子之間的距離。R₀: Donor 因 FRET 效應而有 50% 能量被轉移至 Acceptor 的距離，一般最 R₀ 常見的距離為 30-60 Å [17,19]。

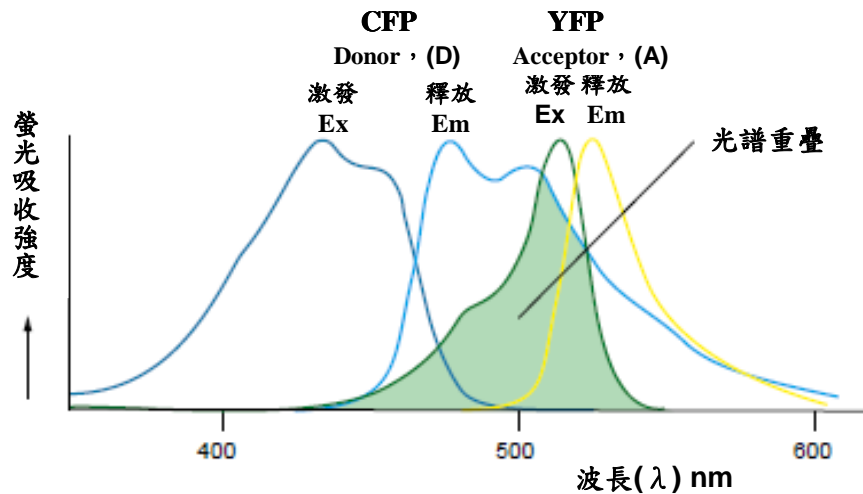


圖 4 CFP 螢光蛋白及 YFP 螢光蛋白的 FRET 螢光光譜

以 CFP 螢光蛋白做為 Donor (D), YFP 螢光蛋白做為 Acceptor (A) 的螢光光譜。Donor: CFP 螢光蛋白質, 深藍色波形為其激發光; 淡藍色波形為其放射光。Acceptor: YFP 螢光蛋白質, 深綠色波形為其激發光 Excitation; 淡黃色波形為其放射光 Emission。綠色區塊為 Donor 釋放光與 Acceptor 激發光的光譜重疊的位置。Ex 指 Excitation 激發波, Em 指 Emission 釋放光。產生 FRET 現象必須有以下條件: 1. Donor (D) 必須能釋放螢光 2. Donor 及 Acceptor 間必須要有光譜重疊[20]。

1-4 淬熄效應 (Quenching)

淬熄效應 (quenching) 屬於能量轉移效應的一種, 原理為分子受到光刺激後, 電子從基態躍遷到激發態, 然而從激發態回到基態的過程中, 與處於基態的淬熄分子 (quencher) 結合, 導致部分分子能量喪失使總光能強度下降[21]。

影響淬熄效應的因素: (1) fluorophore 與 quencher 彼此距離; (2) 溶劑的極性或溶液的 pH[22-24]; (3) 所用緩衝液的離子強度 [25,26]; (4) 色胺酸(Tryptophane)的殘基 (Residue) 暴露或埋入的狀態[27,28]; (5) 淬熄分子的特性[29,30]; (6) 淬熄分子的濃度。

1-5 生物體發光

生物冷光(Bioluminescence)屬於化學發光(Chemiluminescence, 簡稱 CL)的一種 [31,32]。通常化學反應都以熱能的形式釋放能量, 但化學發光是在低溫、無光的環境下, 仍然可藉由化學反應產生激發能而釋放光能且不會產生高熱。生物發光分為直接發光及間接發光兩種。直接發光指分子本身容易達到電子基態且又能產生有效光的雙重官能基。也就是說由 A、B 兩物質發生化學反應生成 P 物質, 被激發光 (Excitation) 刺激, 造成反應能量被 P 物質分子吸收並躍遷到激發態 P* 當 P* 回到基態的過程中釋出能量並產生放射光(Emission)。而在此過程中由於 P 物質直接參與反應

並產生 P* 的放射光，故稱直接化學發光，如 GFP 螢光蛋白發出螢光；間接發光又稱能量轉移化學發光，因為在化學發光的反應中，提供能量的發光劑與負責產生冷光的冷光劑不是同一個分子。也就是說由反應物 A 和 B 反應產生提供能量的激發態中間體 C*，當 C* 反應時釋出能量，使 D 被激發而躍遷到激發態 D*，當 D* 躍遷回基態過程中，放出能量並產生放射光。負責提供能量指 C* 和負責發出螢光指 D 是不同分子，其彼此藉由能量的轉移而發光，主要的例子如讓螢火蟲發光的發光素-發光酵素系統[33]。

1-6 綠色螢光蛋白(Green Fluorescence Protein,GFP)介紹

綠色螢光蛋白起源及發展

2008 年諾貝爾化學獎頒發給研究螢光蛋白的三位科學家，因為 GFP 使原本看不見的東西，變成看得見，也變成更容易觀察活生物體基因表現。在 1960 年日本化學家下村脩(Osamu Shimomura) 在太平洋東岸北美海域的深海中發現具有生物螢光的水母(Aequorea Victoria)，具有一般水母的外型，但在其傘狀頂部邊緣，可發現綠色的螢光。在螢光水母內，Aequorin 為一種可將儲存的 ATP 的化學能轉換成光能的冷光蛋白(chemiluminescent protein)，後來又發現純化 Aequorin 蛋白質可得到 GFP 此種綠色螢光蛋白。也就是說 Aequorin 和 GFP 這兩種蛋白質藉由不同的發光機制產生螢光 [9,34-36]。

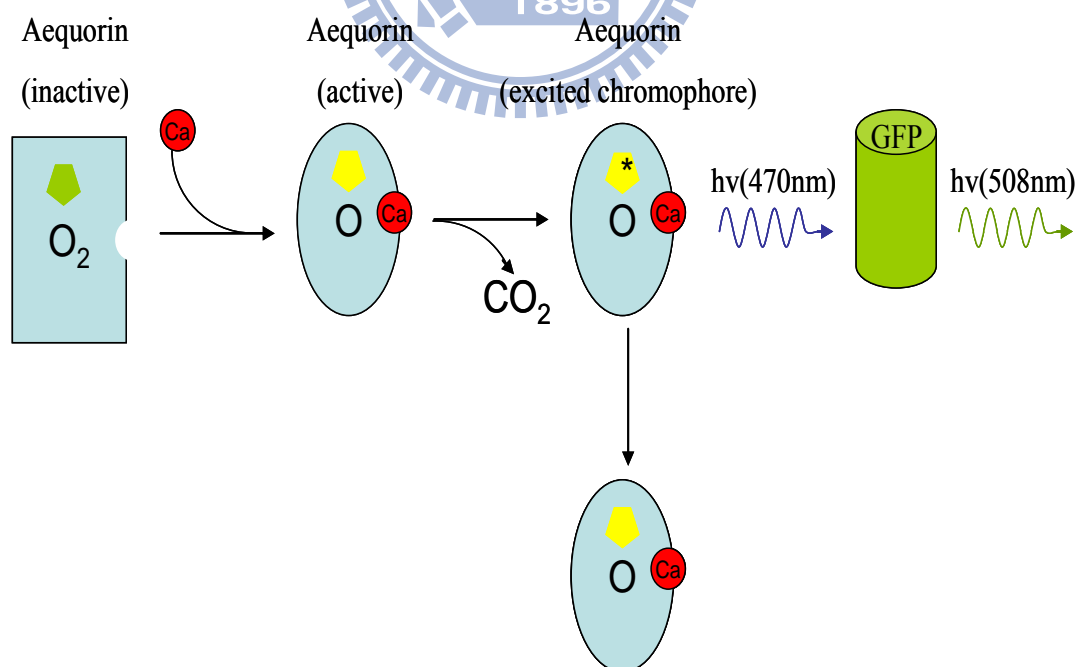


圖 5 Aequorin 的發光機制示意圖

Aequorin” 在經過鈣離子的催化後，經過氧化反應，會釋放波長 470nm 的藍色螢光。此色螢光會傳遞能量激發 GFP，使 GFP 釋放波長 508nm 的綠色螢光。

Aequorin 這種會將化學能轉換形成光能的冷光蛋白(Chemilluminescent protein)可與鈣離子結合，將儲存於 Aequorin 中的 ATP 化學能進行發生化學反應產生光能。此過程為 Aequorin 中的 coelenterazine 氧化成 coelenteramide，並釋出 470 nm 的藍光，而此時發現 GFP 吸收 Aequorin 釋出的藍光後，放出 508 nm 的綠光螢光[37-39] (圖 5)，後來發展應用於偵測細胞體內鈣離子的濃度[40]。

然而從水母發現的綠色螢光蛋白，其發螢光的機制是建立在螢光蛋白質的結構，其內可形成共振的環狀發光基團[9]。另外後來陸續被 Morin 等人從腔腸動物的某些物種中如水螅(Obelia)及海葵(Renilla)、珊瑚蟲(Discosoma)等發現會發螢光的蛋白[41]，因為這些會發螢光的蛋白，具有類似的螢光基團結構，所以有 GFP-like protein 的名稱[42]。同時間 Morin 等人提出能量轉移理論，指出由化學發光的 aequorin 所發出的藍光會刺激 GFP，將光能轉換成綠色螢光[20,43,44]。1974 年 Morise 純化出 GFP 蛋白並獲得蛋白的質結晶[45,46]；1978 年 Prendergast 和 Mann 將 GFP 的單一分子量明確算出來約 30kDa[47,48]；1992 年由 Cubitt 等人選殖出來，1994 年 Chalfie 等成功將綠色螢光蛋白的基因轉移 (transgene) 到大腸桿菌 *E.Coli* 和線蟲 *C.elegans* 中，並且表現出穩定的螢光[36,47,48]；1980 年華人化學家錢永健(Roger Y. Tsien)發展的能發出各種顏色的螢光蛋白質[36,49]。

綠色螢光蛋白結構及發光機制

GFP 蛋白是由 238 個胺基酸所組成的單一蛋白質鏈 (single polypeptide) [50]，大部分的胺基酸形成 11 條的 β -sheets (β -摺版) 的二級結構緊密的聚在一起，形成筒狀三級結構，稱為 β -barrel，其 3D 立體結構為圓面直徑為 30 nm、高度 40 nm。另外桶狀蛋白 (β -barrel) 中軸上有一條 α -helix，而參與激發螢光的發光基團 (chromophore) 位於這條 α -helix，將發光基團包圍在 β -can 的內部，成一個不受外界環境影響的穩定空間[43,51] (圖 6)。

GFP 的發光基團主要由 Ser₆₅-Tyr₆₆-Gly₆₇ 三個胺基酸組成[52] (圖 6)，經由環化、脫氫、氧化三步驟形成多重的共軛雙鍵的共振系統而發出螢光。詳細介紹發光的機制如下，1.環化作用：藉由單鍵旋轉，使 Tyr₆₆ 兩側的醯胺鍵逐漸靠近，此時 Ser₆₅-Tyr₆₆ 醯胺鍵上氫氧基的氧原子，與 Tyr₆₆-Gly₆₇ 醯胺鍵上的 N-H 非常接近，使的陰電性極大的氮原子，與部分帶正電的 C=O 雙鍵中的碳原子形成親核作用，產生新的鍵結。使原本兩個醯胺鍵結的位置產生一個五元環(Imidazolidone ring)，且碳的旁邊新接一個氫氧基，提供脫水位置。2.脫水：在五元環上的氫氧基和鄰近氮上的氫原子脫出，形成一分子水持留下一個雙鍵結構。3.氧化：在鄰近 Glu₂₂₂ 協助下，氧分子在 Tyr₆₆ 的 C α -C β 鍵進行脫氫，產生 C-C 雙鍵，使苯環與 Imidazolidone ring 之間

的雙鍵可以互相溝通，形成 p-hydroxybenzyliden-imidazolidinone 的共軛(conjugate)結構[53]，這個結構形成 π 共振系統 (π -resonance system)，當受到適當波長的光線激發時，此系統上的電子便會被激發而放射出螢光[42,43,54]。形成這步驟需要吸收可見光並放出螢光[55,56](圖 7)。

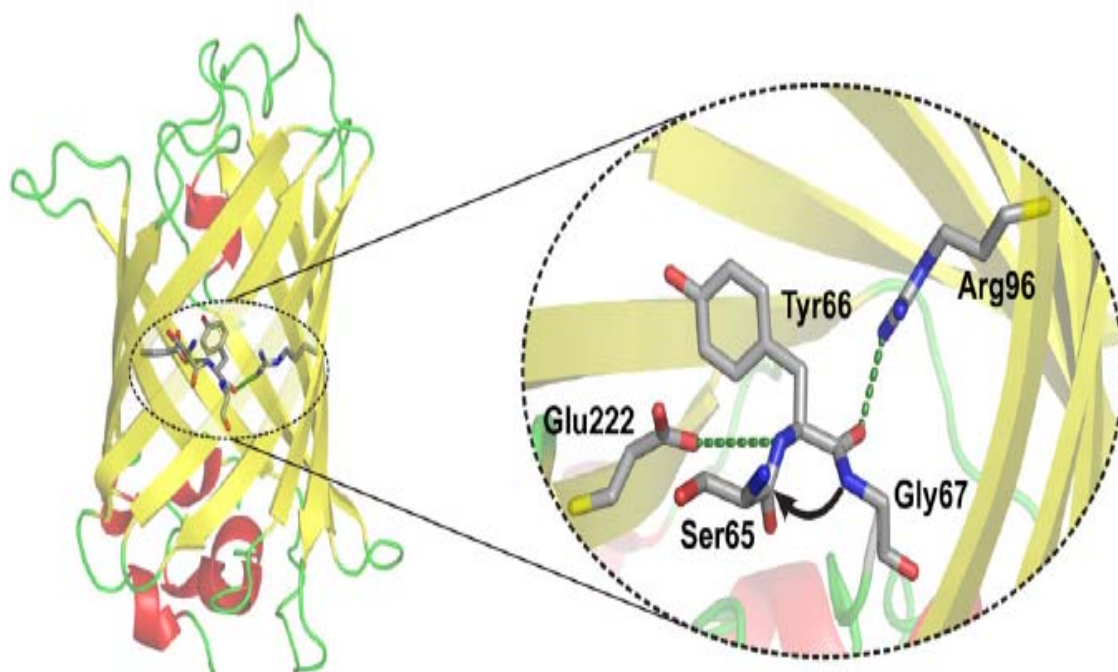
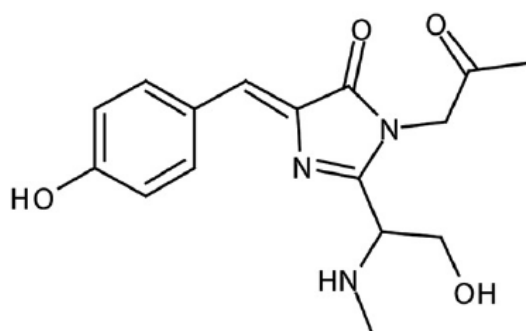


圖 6 GFP 的發光基團結構

1896

GFP 是一個筒狀結構，由 Ser₆₅-Tyr₆₆-Gly₆₇ 三個胺基酸組成，鄰近 Glu222 及 Arg96 可以協助穩定 Ser₆₅-Tyr₆₆-Gly₆₇ 結構[57]。

(a)



4-(*p*-Hydroxybenzylidene)-5-imidazolinone

(b)

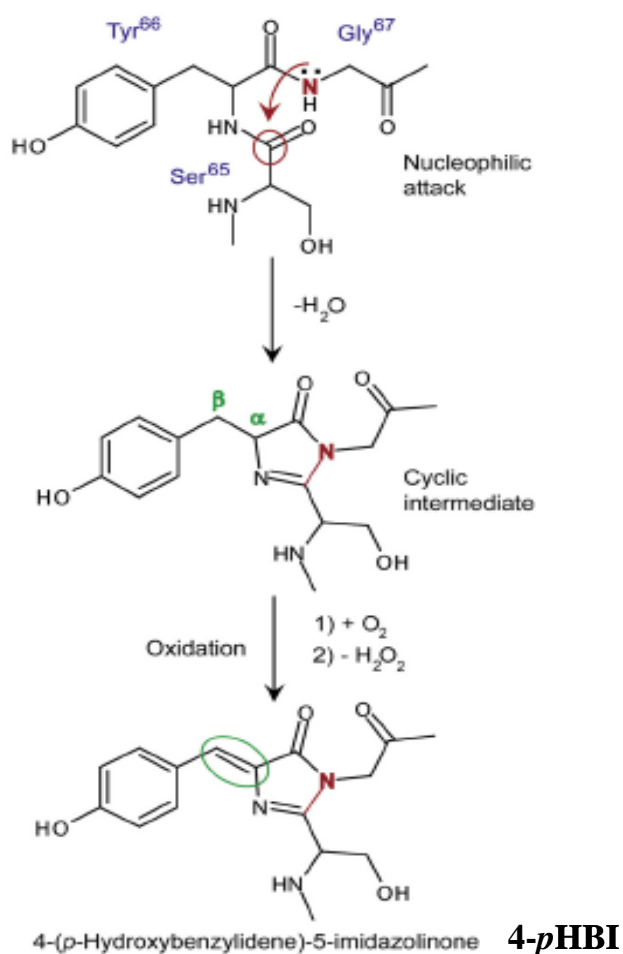


圖 7 GFP 發光機團與其機制

(a)發螢光的共振結構示意圖：p-hydroxybenzyliden-imidazolidinone 的共軛(conjugate)結構[57]。

(b)為 Ser₆₅-Tyr₆₆-Gly₆₇經由環化、脫氫、氧化產生螢光的步驟[57]。

GFP 的激發光及放射光各有兩個波段，當發光基團為電中性時其激發光為 470 到 475 nm，放射光為 503 nm，而發光基團帶負電時其激發光為 395 到 397 nm，放射光為 508 nm，這是因為原本是電中性的發光基團會因為 Tyr₆₆ 上的酚基失去一個

氫離子而帶負電，使得激發 π 電子所需要的能量降低，而一般狀況下這兩種構型都會存在 [9,49,54,58,59]。

綠色螢光蛋白的穩定性

GFP 本身對溫度具有高穩定性，在溫度達到 65°C 時，仍可保持其結構並具有活性 [60,61]；並且 GFP 在 pH5.5 到 pH12 的範圍均可保有較佳螢光強度，小於 pH4 及高於 pH12 會有螢光失活現象發生[61]；GFP 對蛋白質變性試劑耐受性很高，如：8M urea、6M guanidine hydrochloride、1% SDS 中皆非常穩定，但若將 GFP 置於 6M guanidine hydrochloride 並加溫到 96°C，則蛋白質就會失去活性[61]。

螢光蛋白應用及種類

突變 GFP 可得到更多類型的螢光蛋白可以應用在生物技術上，做為一個良好的標記材料，可廣泛應用在偵測基因在細胞體內的表現、蛋白質交互作用的研究。其最大特色是不需要任何酵素及輔酶的作用，自行進行蛋白質摺疊，隨後利用 UV 燈即可觀察其表現，另外其他突變的螢光蛋白的簡介請參考(表 1) [9,43,49,55,57,62-64]。

表 1 突變 GFP 螢光蛋白種類

名稱	激發光/放射光	突變位置	螢光變化
EBFP	380-383 nm / 440-447 nm	Tyr66 ->His66	藍光
ECFP	433 nm / 475 nm	Tyr66 ->Trps66	藍綠光
EYFP	513 nm / 527 nm	Ser65 ->Gly65 Val68-> Leu68	黃光
EGFP	488 nm / 507 nm	Ser65-> Thr65	更易更容易離子化 (Ionization)，增加螢光強度。

1-7 金屬硫蛋白(Metallothionein, MT)介紹

金屬硫蛋白(圖 8)為一種熱穩定且非酵素性之低分子量(約 6-7 kDa)蛋白質，最早於馬腎臟中純化得到的鎘結合蛋白質[5,7]，普遍存在於原核與真核生物中。

金屬硫蛋白(Metallothionein, MT)為熱穩定蛋白質，無苯環(Aromatic)胺基酸、疏水性(hydrophobic)胺基酸、無 α -helix 或 β -sheet 等結構，含有 61-68 個胺基酸(amino acid)，內具有 20 個高度保留的半胱胺酸(cysteine, Cys)約佔 23-33%，其保守序列為 Cys-Cys, Cys-X-Cys 或 Cys-X-Y-Cys (X 為任意的胺基酸)，半胱胺酸硫氫基與一價或二價的過渡金屬元素形成硫金屬鍵結 (對金屬親合性為 $Zn^{2+} < Pb^{2+} < Cd^{2+} < Cu^{+} < Ag^{+} = Hg^{2+} < Bi^{3+}$ [65])，形成高金屬含量(4-12 atoms/mole)的金屬硫氫基團(metal

thiolate cluster) [3-6]，造成兩個金屬鍵結團簇(α -、 β -Cluster)。MT 與體內必須重金屬（鋅、銅）之調節、毒性重金屬解毒作用以及活性氧化物質清除中扮演相當重要之角色[66-69]。

Metallothionein protein (MT)

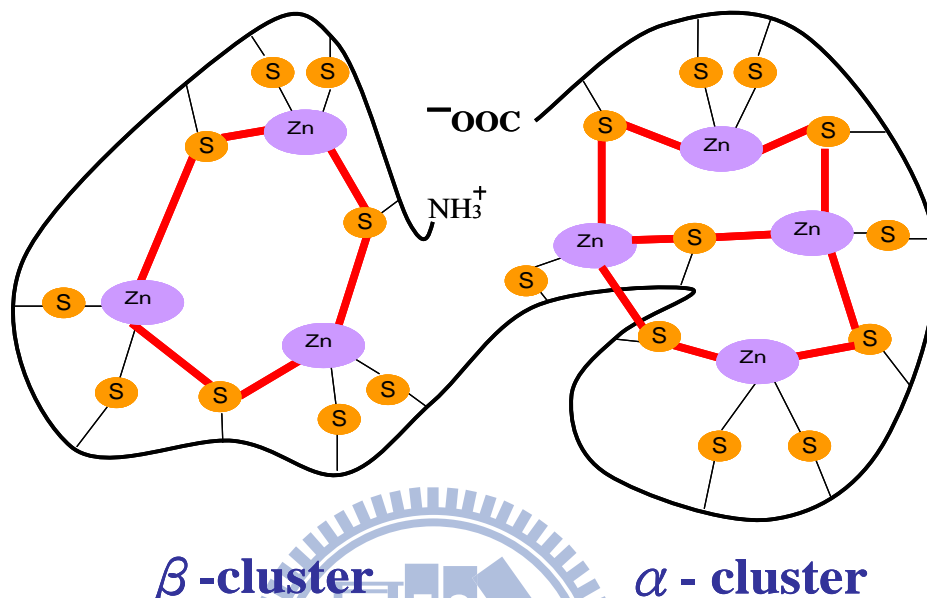


圖 8 金屬硫蛋白(Metallothionein, MT)結構示意圖

金屬硫蛋白(Metallothionein, MT)形成兩個金屬鍵結團簇(α -、 β -Cluster)，含 20 個高度保留的半胱氨酸(cysteine, Cys)與重金屬形成硫金屬鍵結。MT 的 C 端 (Carboxyl terminal) 由 31 到 61 個氨基酸組成含 11 個半胱氨酸，形成 α -金屬鍵結團簇(α -Cluster)，鍵結 4 個二價金屬離子的 (M4S11)₃-的團簇；MT 的 N 端(amino terminal)由 1 到 30 個氨基酸組成含 9 個半胱氨酸，形成 β -金屬鍵結團簇(β -Cluster)，鍵結 3 個二價金屬離子，形成了 (M3S9)₃-的團簇。M 指二價金屬離子(Zn²⁺, Cd²⁺, 或其它金屬離子)。這兩個離子結合的團簇整體的大小約 3-4nm，其結構如“metal semiconductor, MS”的複合結構。[70-73]

MT 依結構特性分為三類[74], Class I: 半胱氨酸結構位置與馬的 MT 類似，如哺乳類動物的 MT [75-78]; Class II: 半胱氨酸結構與來自馬的 MT 相似度低，例如酵母菌的 copper-thionein [79,80]; Class III: 大部分存在植物或微生物體如植物的 phytometallothionein[75,81-84]。

Binz 和 Kagi 在 1999 年提出新的分類方式[75,85]，新分類系統是依據序列的相似度以及親緣關係進行分類，分類包括 16 個 MT 家族 (families) [86]、10 個 MT 亞家族 subfamilies)、MT 群 (groups) 及 MT 同分異構物 (isoforms) [87]。舉例來說，MT 家族 (families) 分出的 16 個 MT 家族，其中 MT 家族 (Families)I 為脊椎

動物的 MTs，其親源遺傳特徵再分為 10 個亞家族 (subfamilies)，分別是哺乳類 MT-1、MT-2、MT-3、MT-4[88][89,90]及哺乳類未區分之 MT；鳥類 MT-1、MT-2 及鳥類未區分之 MT；兩棲類 MT 及硬骨魚類 MT [91,92]。而 MT 家族 II 為軟體動物類、MT 家族 III 為甲殼類、MT 家族 IV 為棘皮動物類、MT 家族 V 為雙翅類、MT 家族 VI 為線蟲類、MT 家族 VIII 為纖毛蟲類、MT 家族 IX~XIII 為黴菌類 MT 家族、MT 家族 XIV 為原核動物類、MT 家族 XV 為植物類[87]。

哺乳類動物具有多 MT 基因家族，泛稱 MT 異構型(iso-metallothionein)，可分成四個次群: MT-1，MT-2，MT-3[77]，MT-4 [88,93-96]；MT-1 及 MT-2 是最主要的普遍存在各種組織中，例如肝、腎、胰臟、腸道等組織[93]，被認為可能分別各在重金屬的代謝與在細胞生長中扮演重要之生理角色。因為 MT-1 及 MT-2 受到如重金屬、醣腎上腺皮質素、氧化壓力及細胞激素以及冷、熱的生理性緊迫因子等刺激會被誘導而表現，這兩型金屬硫蛋白其主要功能為[97]：(1)減低重金屬毒性。(2)維持必須重金屬的體內平衡。(3)自由基的清除。(4)細胞的生長及增殖。[97,98]；而 MT-3 及 MT-4 對生理性的緊迫因子的反應較不敏感，這兩種主要分佈位置，MT-3 主要存在神經系統中，由人類的由腦皮層星狀細胞所分泌，原本命名為生長抑制因子 (growth inhibitory factor) 且通常[66,90,99-102]；MT-4 存在鱗狀上皮組織中 [103]。最近研究指出腦受到一些刺激時會誘導 MT-3 的表現，並在阿茲海默症患者腦中有 MT-3 耗盡的現象[104,105]。

1-7.1 蛋白質結構與摺疊的重要性

1-7.2 蛋白質的變性 (denaturation) 與沈澱

蛋白質的結構與蛋白質的生物功能有相關性[106]，將具有功能性的蛋白質結構定義為自然結構 (Native structure)，又稱此蛋白質為自然態蛋白質 (Native protein)。

在水溶液中，具自然結構的蛋白質分子表面，除了 N 端的胺基 ($-\text{NH}_3^+$)、C 端的羧基 ($-\text{COOH}$) 外，其他殘基之側鏈基團會彼此鍵結，或和游離離子、水鍵結，因此形成水層及雙電層成為穩定的膠體顆粒。

當蛋白質結構受到外在環境的劇烈改變時，蛋白質內穩定結構完全被破壞，而彼此聚集 (aggregation) 沉澱，且失去生物活性，此狀態的蛋白質稱為變性蛋白質 (denaturation protein)。讓蛋白質變性的方法大致可分三大類：物理法、化學法、生物法等，作用原理是使蛋白質結構改變、降低溶解度、失去生物活性[107]及結晶能力[108]。而其他變性方法參閱(表 2) [106,109-111]。

表 2 蛋白質變性的方法

方法	例子
物理法	高溫、冷凍、壓力、攪拌、超音波
化學法	1.極端 pH 變化 (強酸、強鹼)；2.有機溶劑 (酒精、丙酮)；3.鹽析法 (硫酸銨)；4.化學變性藥劑 (尿素(urea)、胍鹽酸 (guanidine hydrochloride)、二硫代蘇糖醇 (sodium dodecylsulfate))；5.重金屬
生物法	蛋白質水解酵素 (proteolytic enzyme)

1-7.3 蛋白質的復性 (renaturation) 與摺疊 (fold)

蛋白質復性

探討蛋白質從解構(unfold)到摺疊(fold)的過程，將未摺疊或摺疊錯誤的蛋白質，重新展開摺疊到擁有最小自由能(free energy)的特殊三級結構，使蛋白質回復活性，此過程稱為復性 (renaturation)。

蛋白質來源

本實驗是利用細菌產生產量高、純度高、不可溶、不具生物活性的的內涵體 (inclusion body)為蛋白質來源，其內帶有實驗所需的重組目標蛋白 (MTGFP 及 MTekGFP)。為得到具活性的重組目標蛋白質，需經三個步驟包括破菌、清洗內涵體及溶解內涵體，再藉由蛋白質復性與摺疊後，才能得到高純度且具生物活性的蛋白質[112]。

利用內涵體進行復性時，要注意當蛋白質結構被展開後，使疏水性區域的胺基酸鏈大量暴露在蛋白質的外部容易形成聚集體 (aggregation)。在蛋白質復性的過程中，因為結構正確的多勝肽鏈內 (intrachain)與結構錯誤多勝肽鏈間(interchain)產生交互作用(interaction)，進而糾結在一起形成錯誤的雙硫鍵鍵結 (misfolding)[113]。所以最好在低蛋白質濃度下進行復性的過程，避免因聚集體產生而減少自然態蛋白質的產率[114]。

蛋白質摺疊

有研究顯示蛋白質摺疊過程中，不是只有摺疊態與未摺疊態兩種形式。同時也包括了摺疊過程中的摺疊中間體 (folding intermediate) [106,111,115-118]。而蛋白質的結構會受到許多環境因素影響，包括壓力、PH 值、離子強度[119]、溫度[120]等，所以將蛋白質溶液的環境改變時，蛋白質為適應新環境會改變結構，使高能量趨向低能量，當達到自然態時，就是處於最低能量態，維持熱力學上的平衡。另外在蛋白質摺疊的過程中，通常也會添加一些幫助摺疊的試劑，減少聚集的分子間錯誤鍵結[121]及維持適合的氧化還原環境[122]。減少蛋白質分子間錯誤鍵結的添加劑簡介請參考(

表 3)[112,113,121,123]。

表 3 減少蛋白質分子間錯誤鍵結的添加物

添加物	建議濃度
Urea	2 M
Guanidinium chloride (GuHCl)	1 M
Arginine	0.5 M
Glycerol	0.4 M
Sucrose	0.4 M
Lauryl maltoside	0.3 M
Polyethylene glycerol (3350MW)	0.05 % W/V
Tris buffer	0.5 M
Triton X-100	10 mM
Acetamide	2 M
Acetone	1.4M
n-hexanol	5 mM
Salts (NaCl、Na ₂ SO ₄ 、K ₂ SO ₄)	0.5M

蛋白質摺疊的方式

摺疊蛋白質主要分為兩種：直接稀釋法 (Direct Dilution)及透析法 (Dialysis)(表 4)，這兩種摺疊方法的目的是將蛋白質周圍環境的變性藥劑濃度降低或是移除，使變性藥劑其無法破壞蛋白質結構，最終使蛋白質能重新摺疊到正確結構並具生物活性的型態[124]。在本實驗中所使用的方法為兩種方法的改良，稱階段性熱平衡法 (Stepwise Thermodynamics Equilibrium Dialysis)。介紹如下：

直接稀釋法 (Direct Dilution)：將未摺疊的蛋白質，直接從含有高濃度的變性試劑緩衝液的環境，直接稀釋到低濃度變性試劑或無變性試劑的緩衝液[125]。雖降低變性試劑濃度就無法破壞穩定蛋白質結構的力量，蛋白質即可自行摺疊，但用直接稀釋法進行復性的缺點為增加蛋白質溶液的體積，蛋白質濃度會因此降低許多，因此不利於蛋白質回收和純化。

透析法 (Dialysis)：變性溶液的蛋白質利用透析膜的特性，將其置於透析袋內，透析袋外放置大量要置換的復性溶液。由於透析膜只允許比孔徑小的分子通過，蛋白質無法穿透透析膜。藉由膜內外鹽濃度的不一致，造成滲透壓的差異，使溶液中的離子可藉由布朗運動而自由移動，最終使得膜內外離子濃度達平衡，達到將變性藥劑完全移除的目的[126,127]。使用透析法做摺疊，蛋白質最終的回收濃度高，但也很容易形成結構摺疊錯誤的蛋白質及聚集體[128]。於是在 1996 年 Rudolph 等人提出蛋白質濃度維持 0.01~0.05 mg/ml 下有最佳的摺疊效果[129]。

階段性熱平衡透析法 (Stepwise Thermodynamics Equilibrium Dialysis)：階段性熱平衡法準靜態是遵守熱力學平衡的理論，可以將高濃度蛋白質進行蛋白質摺疊，且可避免形成聚集體的方法。實驗利用透析膜的特性，將變性溶液的蛋白質置於透析袋內，透析袋外放置大量要置換的復性溶液，不同的是逐步改變變性藥劑到要置換的復性溶液中的濃度，最終使得膜內外離子濃度達平衡，達到緩慢的將變性藥劑完全移除的目的[126,127]。因為蛋白質在摺疊每一階段都符合準靜態熱力學平衡的定律，因此可避免蛋白質因為周圍環境的劇烈變化而造成沈澱，另外蛋白質有自組織的能力，所以其構形會自發性的摺疊，使能量能連續的改變反應位能，最後達到能量最低態(local minima)也就是自然結構[115]。

表 4 直接透析與階段性熱平衡透析法比較

名稱	特色	蛋白質影響
透析法	透析膜只允許比孔徑小的分子通過，蛋白質無法穿透透析膜，藉由布朗運動而自由移動，最終使得膜內外離子濃度達平衡。	蛋白質最終的回收濃度高，但也很容易形成結構摺疊錯誤的蛋白質及聚集體，
直接透析法	降低蛋白質濃度，減少聚集。	高濃度蛋白質環境下，易造成蛋白質聚集而沈澱。
階段性熱平衡透析法	逐步透析降低變性試劑的濃度到完全移除。	避免因蛋白質周圍環境變化劇烈，造成蛋白質聚集而沈澱。

第二章實驗原理：

2-1 DNA 聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

1983 年 Kary B. Mullis 博士則想出 PCR 技術—現今所發展出來的 PCR 技術放大選殖 DNA 的片段，並且在 1993 年獲得諾貝爾化學獎[130]。PCR 是放大特定 DNA 片段的實驗技術，使欲放大的目標 DNA 序列兩端分別合成能與其形成緩冷配對反應 (annealing) 的前置引子 (forward primer) 和反置引子 (reverse primer)，再利用 DNA 聚合酵素(DNA polymerase)以目標 DNA 的兩股分別做為模板(template)來合成新的 DNA 股。

在理想的 PCR 反應條件下，每執行 PCR 一次其 DNA 產物增加為原來的兩倍，故 PCR 公式為 DNA 增加的量將會是 2^n ，n 是代表 PCR 執行的次數。在本實驗中採用的是 Taq DNA 聚合酶(Taq DNA polymerase)是個耐高溫的酵素，在 95°C 中其活性的半衰期 (half life) 長達 40 分鐘，故可供 PCR 操作使用。其酵素有效作用溫度為 72°C，此溫度下分鐘可合成 2000-4000 個核甘酸(nucleotides)。但 Taq 聚合酵素因為缺乏 3'至 5'端外切酵素 (exonuclease)，所以在 DNA 合成時沒有校對(proofreading) 的功能，在每一個循環中錯誤配對的頻率可高達 1/6000 個核甘酸。

影響 PCR 的 DNA 合成時的精確性之因素:1.核甘酸在 PCR 合成時的濃度，核甘酸的量應控制在 10pg~1ug 之間，過多或過少都會影響 PCR 之精確性; 2.DNA 的長度：以 1kb 以下為宜; 3.循環數:越多時精確度越低; 4.DNA 聚合酶的種類:有校對能力者為佳; 5. Mg^{2+} 的含量：建議在 0.5-2.5 mM 之間，其會影響引子黏合、DNA 雙股打開時所需之溫度、引子形成二聚物等。

2-2 DNA 定序

DNA 定序有兩種方法，分別是 Sanger 法及 Maxam-Gilbert 法。而 Sanger 法是目前市面上所用的定序法，以 DNA 為模板，加入四種不同螢光標示的核甘酸的類似物 ddNTPs (ddATP、ddTTP、 ddCTP、 ddGTP)及適當比例的 dNTPs 和聚合酵素，同時進行聚合酵素連鎖反應。因為核甘酸類似物缺少 3'-hydroxyl group，因此無法與下一個核甘酸的 5'-Phosphate group 形成 phosphodiester bond，使得 DNA 複製終止在這些類似核甘酸的位置上，造成各種長短不一的 DNA 片段。再以高解析度的毛細管電泳技術將這些長短不一的 DNA 片段 分離，最後透過雷射光激發，並利用 CCD 偵測每一片段不同螢光的組合來判讀 DNA 序列。

2-3誘導劑 IPTG

養菌時使用 IPTG 誘導目標蛋白質產生，且 IPTG 其結構式類似乳糖 (lactose) 的誘導劑，其誘導的目標是乳糖操作因子(lac promotor)的抑制蛋白(repressor)，所以 IPTG 或乳糖會使抑制蛋白失活，達到誘導基因的目的。在細菌(*E.coli*) 培養中，添加 IPTG 可有效地在短時間內快速誘導外來重組基因，產生目標蛋白質，但會對細胞新陳代謝能力的產生影響，相對於不帶有質體的菌體，對帶有質體的菌體有較大的抑制作用，使得帶有質體的菌體比生長速率降低，即使沒帶有質體的菌體也會受到影響[131]。一般使用方式多半為先培養菌體到高濃度，再利用誘導劑誘導外來蛋白質，以取得最大量的目標蛋白質。改變 IPTG 的濃度也會使得內涵體形成的位置產生改變，在 IPTG 濃度較低(0.025 ~ 0.1 mM)時內涵體(inclusion body) 會只在細胞間質(periplasm)形成，但如果 IPTG 濃度提高(0.1 mM)，則在細胞間質和細胞質(cytoplasm) 內都會產生[132]。

2-4內涵體 (Inclusion body)

在本實驗中用 MTGFP 基因或 MTekGFP 基因以 *E.coli* 為宿主，大量表現目標重組蛋白，使蛋白質過量生產產生內涵體。內涵體是一種不可溶、密度較大、顆粒狀的無活性蛋白質[133]，內涵體不一定只在受損、突變、生長溫度偏高才會出現在細胞內，當表現蛋白質為有毒蛋白或微生物在細胞內大量表現重組蛋白質時，也會在其內形成不可溶的蛋白質堆積，即為內涵體[134,135]。

形成內涵體的原因有兩種，一種是因為高濃度的重組聚胺基酸鏈(recombinant polypeptide chains) 因疏水性作用力而發生聚集(aggration)且形成無定型的聚合物在細胞內或細胞間質[136];另一種則為原本應在蛋白質分子內形成的雙硫鍵(disulfide bond)，卻形成在兩個蛋白質分子間，使得蛋白質分子串聯形成密度較原本單一蛋白質分子為大的巨型分子。然而內涵體的形成不一定是雙硫鍵的原因，但是經過研究內涵體之所以不能行逆反應變回原來的蛋白質分子，應該與雙硫鍵形成後增加分子的穩定度有關[137]。

以產量及純化的觀點看內涵體，其實利用內涵體獲得蛋白質有許多好處[138-140]：1.可獲高產量的蛋白質，因為內涵體佔全部細胞蛋白質 30% 以上，且內涵體內有 95 % 皆是重組的目標蛋白質，或是每公升菌液可產 8.5 克蛋白質[141,142]2.內涵體因為在分子間有雙硫鍵形成，且可被分解的胺基酸序列都被包埋在內涵體內部，所以不易被蛋白質水解酶 (protease) 水解，3.內涵體為不可溶的蛋白質，可藉由此特性將破菌後的內涵體，利用離心、重複洗滌、膜過濾等方式[143]，分離可溶性蛋白（例如：核酸、磷脂、及其他水溶性蛋白質），減少純化步驟[144]。

有研究建議洗滌內涵體時，可依狀況添加低濃度的尿酸或胍鹽酸或 EDTA 等，可移除可能會吸附在內涵體表面或疏水性區域上的雜蛋白，增加復性的效率[145]。

2-5 蛋白質變性與沈澱

蛋白質發生變性時，其多肽鏈的共價鍵並沒有斷裂，被破壞的只有蛋白質的二級、三級、四級結構。然而蛋白質變性時，常會造成蛋白質溶解度降低而產生沉澱。

常見的蛋白質沉澱法：

強酸(強鹼)沉澱法:在中性蛋白質溶液中加入強酸(或強鹼)，使羧基(或胺基)變成未解離之羧基(或已質子化之胺基)，而可接電子之氮原子，因質子化造成蛋白質帶有正電荷(或去質子化而不帶電荷)，導致蛋白質受到離子鍵(鹽橋鍵)及氫鍵等破壞，使蛋白質溶水性變差而沉澱。

有機溶劑沉澱法:加入水溶性有機溶劑(如：酒精、丙酮等)因為其具有低介電常數，所以會造成蛋白質間正負電荷結合力增加，形成厭水性膠體使水與蛋白質間作用力減低，而蛋白質溶解度下降隨即發生沉澱而沉澱。

重金屬離子沉澱法:蛋白質在水溶液中是酸鹼兩性電解質，在 pH 7.0 或以上溶液中，蛋白質分子大部分帶負電荷，故能與正電荷的重金屬離子結合，中和蛋白質其負電荷，形成蛋白質鹽沉澱出來，此種沉澱稱為蛋白化重金屬。

植物鹼沉澱法:利用生物鹼之酸根與蛋白質之陽離子電荷結合形成難溶性鹽類而沉澱。常用的生物鹼有鞣酸、三氯醋酸(trichloroacetic acid)、磷鉬酸、苦味酸及 sulfosalicylic acid 等。當 pH 小於蛋白質等電點時，沉澱最明顯。

鹽析法(salting out):於蛋白質溶液中加入多量輕金屬鹽類，改變溶劑介電常數，使蛋白質間作用力增加而沉澱。一般常用硫酸銨鹽 $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ 沉澱蛋白質。

加熱沉澱法:幾乎所有的蛋白質都會因為加熱變性而凝固，產生不可逆的沈澱。蛋白質在等電點時，加熱凝固最完全且迅速。但在酸性或鹼性溶液中，蛋白質帶有正電或負電時，雖加熱蛋白質也不會凝固，除非同時有足量的中性鹽存在，則蛋白質即可因加熱而凝固。

2-6 各種常見的化學變性劑

一般常用的化學變性劑溶解內涵體，或將糾結聚集在一起的蛋白質質結構解開，其作用原理簡單介紹如下：

尿素 (Urea)：

一般建議使用高濃度的尿素 9 M，破壞分子內氫鍵及疏水性作用力，而在本實驗中，我們使用 4.5M 的濃度來達到蛋白質的變性[146]。

胍鹽酸 (Guanidine hydrochloride, GuHCl)：

一般建議濃度 6 M，主要可破壞分子內疏水性作用力及離子性作用力。和尿素一樣是和蛋白質分子間形成氫鍵鍵結且其作用力大於穩定蛋白質結構之力量，因而將蛋白質拉開至鬆散的構形。此外亦可伴隨著添加少量氯化鋰 (LiCl) 或氯化鈉 (NaCl) 等鹽類，以加強破壞離子性作用力[146]。

鹽類：

常用氯化鈉(NaCl)、氯化鉀(KCl)、氯化鋰(NaLi)，主要破壞離子性作用力[147]。

還原劑 (reducing agent)：

一般常用二硫代蘇糖醇 (dithiothreitol, DTT)[148]、DTE (dithioerythritol)、半胱胺酸(cysteine)、 β -巰基乙醇(β -Mercaptoethanol)[110]等，主要作用是破壞雙硫鍵，並加入還原劑將雙硫鍵還原成巰基。由於雙硫鍵為共價鍵結，為穩定蛋白質結構最主要力量，因此要完整破壞其結構還需要尿素或胍鹽酸的協助方可達成。另外無雙硫鍵的蛋白質，像 *Bacillus subtilis* α -amylase 則不需添加此種還原劑。

清潔劑 (detergents)：

常用的清潔劑有包括十二烷基硫酸鈉 (sodium dodecylsulfate, SDS)[149]、n-cetyl trimethylammonium chloride[150]、sarkosyl[151]、sodium n-lauroyl sarcosine[152]等，利用清潔劑本身親水性基將蛋白質的立體結構解開成直鏈，使蛋白質疏水性區域裸露出來，並帶負電荷。可將蛋白質立體結構拉開並帶負電荷[110]。最有名的例子，就是用在跑蛋白質變性電泳時，用 SDS 使蛋白質變性。

pH 值：

胺基酸的組成中含有氨基($-\text{NH}_3^+$)與羧基($-\text{COO}^-$)這兩種基團，在高 pH 值的環境中氨基會失去一個氫原子而變成 NH_2 ，使得胺基酸帶負電，在低 pH 值的環境中羧基會接上一個氫原子形成 COOH 而使胺基酸帶正電。因此在高、低 pH 值的環境中，蛋白質會因為胺基酸之間有庫倫作用力互相相斥，而無法正常的排列、組織成自然的結構。

金屬螯和劑

一般常用乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) 及 2-巰基乙醇 (ethylene glycol tetraacetic acid, EGTA) 等金屬螯合劑，其會與溶液中的金屬結合，形成穩的螯合物，避免金屬影響化學反應的進行。

2-7 蛋白質摺疊 (Protein Refolding)

探討蛋白質由一無特定構形的鬆散結構摺疊到具有特殊構形的過程，其分子內結構變化及分子間交互作用是目前熱門的研究。蛋白質摺疊的機制在真核細胞與原核細胞中可分為 Chaperonin-dependent 與 Chaperonin-independent 兩種[153]。對於小分子蛋白質而言是不需要 chaperones 即可自行摺疊到自然態；但大分子蛋白質在摺疊過程中，需要 chaperones 的協助才能順利摺疊到自然態，因為 chaperones 可結合到暴露在親水環境中的疏水性的胺基酸鍊上，避免蛋白質分子產生交互作用造成聚集而影響摺疊效率[154,155]。

本實驗用階段性熱力學平衡透析法來做蛋白質摺疊，這個透析法的理論基礎是建立在 2002 年提出的 First-order like state transition model[115]，這是一個首先探討蛋白質在準靜態熱力學平衡的過程摺疊的模型。並且此理論與 1937 年的相轉換理論相符合[156]。而 First-order like state transition model 可以有效的降低摺疊過程中蛋白質分子的交互作用，避免聚集現象產生[157]。另外根據這理論所衍生出的階段性熱力學平衡透析法，可以使蛋白質摺疊路徑有效率的繞過相轉變區間 (即 over-critical point reaction path) 達到自然態。已經有許多研究是利用階段性熱力學平衡透析法成功的將蛋白質復性到自然態，且添加一些化學物質幫助蛋白質摺疊，就像 chaperons 協助蛋白質摺疊的角色一樣[111,115,157,158]。由於階段性熱力學平衡透析法，其整體溶液交換擴散反應是緩慢進行的，再加上此透析方法縮小溶液中起始狀態及末狀態的差異，因此整體溶液置換的速率是非常緩慢的，約需 8 到 48 小時才能達到平衡[159]。且對於利用階段性熱平衡透析法摺疊的蛋白質來說，因為其摺疊速率在 10^{-9} ~ 10^3 秒之間，所以在整個摺疊過程幾乎一直處於平衡狀態，所以把這種溶液置換的過程稱為準靜態過程 (quasi-static process)(圖 9)。

實驗步驟內的詳細原理記錄於下方：

蛋白質變性 (denature)：第一步就是要讓本實驗中目標蛋白 (MTGFP 及 MTekGFP) 的蛋白質變性，本實驗當中所使用的變性緩衝溶液(Denature Buffer)，包含有 4.5M 的尿素(Urea)用來破壞蛋白質內氫鍵與疏水作用力等，一些非共價鍵結力；0.1M β -ME (β -Mercaptoethanol)是抗氧化劑，也可防止雙硫鍵形成，且本實驗的蛋白質，具有含硫的氨基酸半胱胺酸)之間容易形成雙硫鍵，藉由高濃度的 β -ME 可以有效的將雙硫鍵(S-S)還原成硫氫鍵(S-H)。而一般常用為緩衝溶液的有磷酸(phosphate)與三羥甲基氨基甲烷(Tris)，phosphate 為酸性的緩衝液，而 Tris 則是鹼性的緩衝液。本實驗的蛋白質，是在鹼性環境 Tris buffer 下進行摺疊。除了變性劑和還原劑之外，還有加入 0.5%的甘露醇(Mannitol) 和 0.1mM 的 Pefabloc，這兩種藥劑

的功能主要是用來保護在水溶液中的蛋白質。甘露醇能保護蛋白質的側鏈分子，避免在高度氧化、還原的環境下發生一些修飾(modify)作用。而 Pefabloc 是一種可抑制蛋白質分解酶的化合物(synthetic protease inhibitors)，也能避免蛋白質被分解。它和蛋白質分解酶產生不可逆的共價鍵結，使分解酶失去活性，就無法分解蛋白質。因此在摺疊的過程中，都會加入 Pefabloc 來保護蛋白質不會被分解。另外低濃度(0.1mM)的 β -ME 可以當做抗氧化劑，其作用和甘油(glycerol)相似。

階段性熱平衡透析法 (Stepwise Thermodynamics Equilibrium Dialysis) 的過程：第二部取得變性蛋白質後，用 0.22 μ M 過濾蛋白質樣品，再將蛋白質樣品裝入只允許小於 3kD 的蛋白質通過的透析袋內，並將半透膜置放於 2.5L 的摺疊緩衝溶液 (Refolding Buffer) 中，使高濃度的變性劑及還原劑可緩慢擴散到外面低濃度的摺疊緩衝溶液中，使膜內變性劑及還原劑濃度降低，因此可避免環境劇烈變化而使蛋白質沈澱的現象，使蛋白質順利的進行摺疊。

在本實驗中設計 5 個的階段性的摺疊步驟，透過 5 種摺疊緩衝溶液使蛋白質摺疊的環境緩慢的改變到接近自然態的環境。這五種階段的緩衝溶液，分別稱為 R1、R2、R3、R4、R5 的摺疊中間體，則稱 M1、M2、M3、M4、M5。而五個階段中，前三階段(R1~R3)將變性劑尿素從 4.5M 依次減為 2M、1M，然後移除；而還原劑 β -ME 則從 R1 開始就降為 0.1mM 當做保護劑；而摺疊緩衝液的 pH 值從 R4 開始調到接近中性(pH=8.8)；而 R5 在最後一個階段移除保護劑 Mannitol，使環境接近自然狀態，讓蛋白質能摺疊至自然結構。另外收集每個階段蛋白質所形成較穩定的摺疊中間體 (folding intermediates) 的結構，以提供後續蛋白質結構分析的量測。

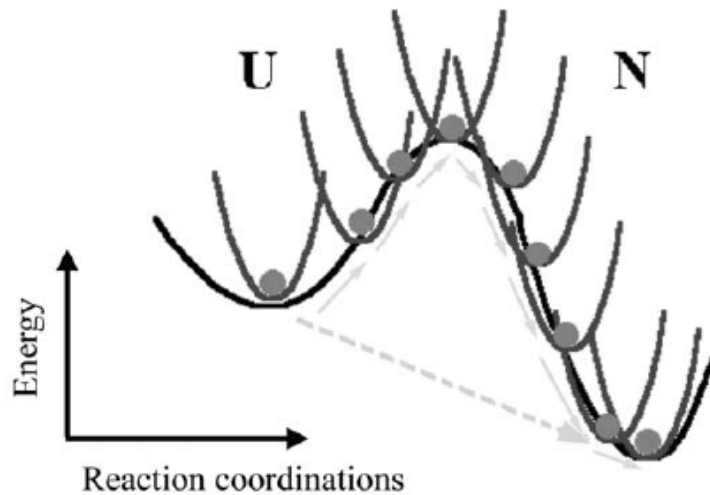


圖 9 能量改變示意圖

階段性熱平衡透析法的過程符合熱力學之準竟過程，在每一個位能改變的過程都能達到熱力學的平衡狀態，也就是局部能量的最低態。所以使蛋白質從未摺疊到摺疊完全的自然態，可以逐步緩慢的進行摺疊，避免蛋白質因外在環境劇烈變化而產生沈澱現象[160]。

2-8 圓二色光譜儀 (Circular Dichroism, CD)

CD 光譜可分析蛋白質的二級結構比例： α -螺旋 (α -helix)、 β -板狀 (β -sheet)、迴路 (turn)、及無序纏捲 (random coil)[161]，因此探討蛋白質摺疊過程中其二級結構的變化。胺基酸分子大部分都具有光學活性，除甘胺酸 (glycine) 以外，其餘的氨基酸從胺基酸的結構來看，皆是一個四面體的形狀，且四個角都帶有不同的基團 (碳基、胺基、羧基、R 基)，且各基團在空間中的不同排列，而形成兩種不同構形的胺基酸。而稱這樣不同的構形為鏡像異構物 (enantiomer)，或是生物分子的手性 (chirality)。而這類分子光學活性的來源是由於能產生左旋或右旋偏極光，能產生左旋偏極光稱為左旋異構物 (levorotatory isomer, L-form)；而能產生右旋偏極光則為右旋異構物 (dextrorotatory isomer, D-form)。因此胺基酸具有光學活性的特色，所以由胺基酸組成的蛋白質其立體結構也具有光學活性，尤其以二及結構最具有特徵。故當圓形入射光視為左右旋光向量之合通過水溶液中的蛋白質時，將會吸收與電子雲方向相同之電場，而使入射光產生偏轉角度，最後最後利用圓二色旋光光譜儀就是透過計算左旋偏極光 (LCPL) 與右旋偏極光之差異 (RCPL) 吸收，得到蛋白質吸收橢圓率，可畫出個吸收特徵圖形[162]。

一般測量蛋白質其 CD 波長範圍 260-195 nm，典型的 α -helix 在 222nm、208nm 擁有兩個負波，但在 192nm 左右有一個正波；而 β -sheet 在 210nm、222nm 有兩個負波，但在 195nm 有一正波；而 turn 的結構是在 190nm 有一波，但 208nm 左右有一正波[163]。

2-9 動靜態光散射儀 (Dynamic Light Scattering,DLS)

用來分析蛋白質在摺疊過程中，各摺疊階段的溶液內蛋白質大小的分佈情形。利用雷射光射入蛋白質溶液內，因為雷射光撞擊到溶液中的蛋白質後會產生散射光，而散射光會依著時間產生變化。所以可由測量散射光計算出粒子之粒徑分佈情形。由於蛋白質粒子處於溶液中，因本身具有動能所以會產生不規則的擴散運動 (Diffusion motion)，另外粒子的大小也會影響粒子之擴散速度與布朗運動，加上雷射光照射的區域粒子數量和位置不同。使得訊號到達偵測器時會產生光程差，產生干涉影響光線強度，因粒子位置會隨時間改變，因此散射光亦會隨時間改變。而透過這樣的變化，可以得到所謂的擴散係數，而根據 Stokes-Einstein 方程式：

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_H}$$

D 是擴散係數， k 是波茲曼常數， T 是絕對溫度， η 為溶液之黏滯係數， R 為水合半徑。我們就可測量到在溶液中蛋白質的粒徑大小。

2-10 螢光儀(Fluorescence)

大部分的蛋白質中都具有芳香族的胺基酸，分別是酪胺酸(tyrosine)、色胺酸(tryptophan)和苯丙胺酸(phenylalanine)，這些芳香族的胺基酸是一種螢光發色團 (fluorophore)，所以蛋白質是一種螢光物質。然而蛋白質內的這些螢光基團對其四周環境的改變極敏感。當蛋白質的立體結構出現變化時會影響其螢光光譜，當螢光基團在蛋白質中被其他胺基酸基團所包覆而遠離水相時其螢光光譜會有所謂的藍位移 (blue shift)；而螢光基團是暴露在親水性環境中時，其螢光最強波長則會向紅光移動，稱為紅位移 (red shift)[164]。而螢光強度也是一種蛋白質結構穩定的特徵，當蛋白質結構穩定時，其螢光基團的共振結構也是相對比較穩定，所以螢光強度也會相對比較高；若是結構較為鬆散，其共振結構也會不穩定，如此一來螢光的強度會跟著變弱。而透過螢光光譜來分析我們的摺疊中間物可以瞭解蛋白質在摺疊過程中一些結構的變化及其結構的穩定性。另外也可分析蛋白質是否有交互作用，蛋白質間彼此有交互作用則會影響螢光的變化，產生如 FRET 及 Quenching 等現象。

2-10.1 螢光共振能量轉移(Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET)

能量轉移是藉由螢光團之間的偶極-偶極作用 “dipole-dipole interaction”，因此分子間距離與兩螢光團間有極大關係，FRET 的有效範圍約從 10~100 Å，其能量轉移效率 E_{FRET} 的強度與兩螢光分子距離(r)的六次方成反比[17](圖 10、圖 11)。

$$E_{FRET} = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \quad (1)$$

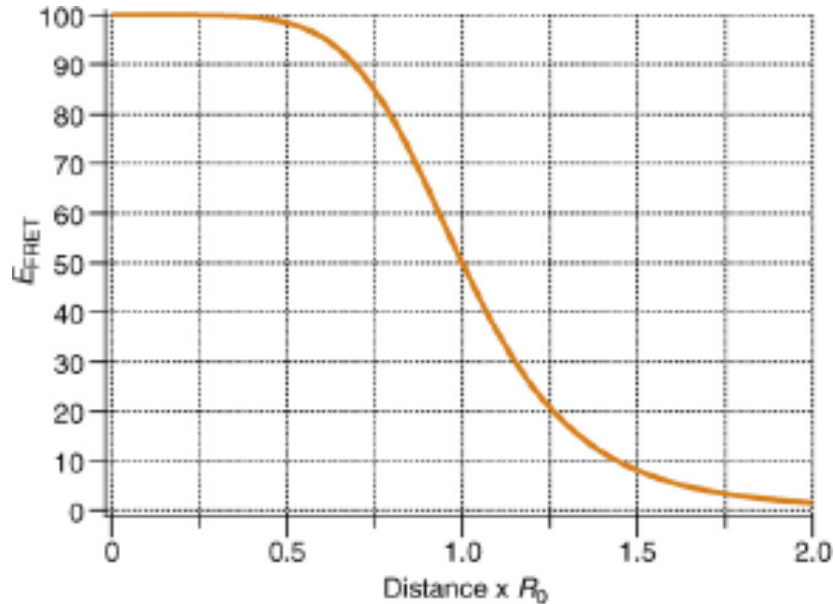


圖 10 FRET 效應與距離的關係

R_0 指 Förster 半徑 (Förster distance) 發生在 FRET 效應轉移 50 % 能量的距離。FRET 效應的強弱與兩分子之間的距離有關，若兩分子之間距離大於 1.5 倍 R_0 ，則不會產生 FRET 效應。

R_0 指 Förster 半徑 (Förster distance)，發生 FRET 效應時，Donor 將 50 % 螢光共振能量轉移到 Acceptor 的距離，其計算公式如下：

$$R_0 = \left[2.8 \times 10^{17} \cdot k^2 \cdot Q_D \varepsilon_A \cdot J(\lambda) \right]^{1/6} \text{ nm} \quad (2)$$

k^2 : 偶極方向因子 (dipole orientation factor)，依兩分子的偏振情況，數值範圍從 0 到 4，如果兩分子是隨機方向其數值則為 2/3； Q_D : Donor 在沒有 Acceptor 的情況下，其螢光量子產率； ε_A : Acceptor 最大吸光係數 ($\text{Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)； $J(\lambda)$: Donor 激發光及 Acceptor 釋放光的光譜重疊處的積分計算如下：

$$J(\lambda) = \int F_D(\lambda) E_A(\lambda) \cdot \lambda^4 d\lambda \quad (3)$$

E_A : Acceptor 的消光係數 (Extinction coefficient of acceptor); F_D : Donor 在 FRET 時的螢光放射強度 (Extinction coefficient of acceptor) 佔總面積的分率。

綜合以上幾點，再次強調當 Donor 激發光譜與 Acceptor 放射光譜有重疊時，表示它們的能階有重疊，故能使共振（resonance）效率提高，導致有螢光共振能量轉移的現象產生[20,91,165-167]

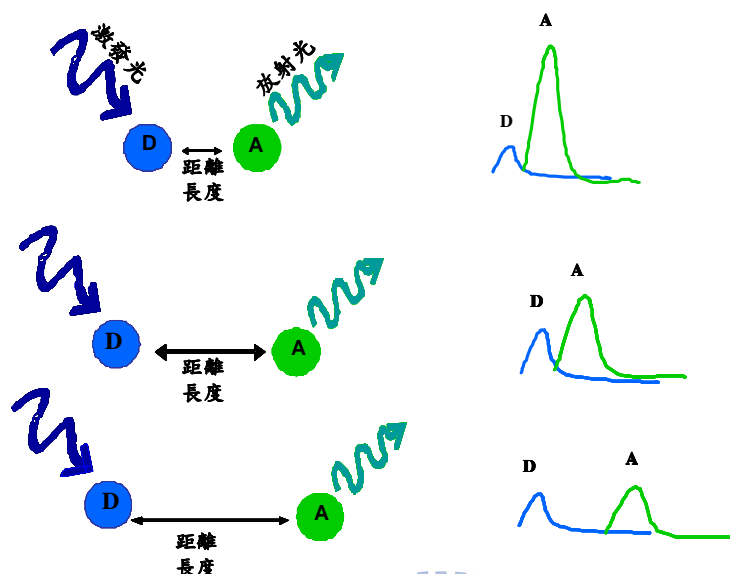


圖 11 FRET 強度與距離的示意圖

Donor 及 Acceptor 之間要有光譜重疊才能產生螢光，若兩分子間距離過長，造成光譜無法重疊則不會有螢光轉移效應產生。

2-11 淬熄效應 (Quenching)

Quenching 為能量轉移效應的一種，其種類分為三種：1.碰撞淬熄 (collisional quenching)、2.靜態淬熄 (static quenching)、3.能量轉移 (energy transfer)[24]。當螢光分子 (fluorophore) 與 quencher 彼此接觸 (contact)，才會有碰撞淬熄與靜態淬熄的發生。常用淬熄分子：氧分子 (O_2)、丙烯醯胺 (Acylamide)、碘離子 (I^-)、氨基化合物 (Amide)、四氧化溴離子 (BrO_4^-)等。

碰撞淬熄效應 (collisional quenching)：研究指出螢光強度與 quencher 濃度呈反比[168,169]；當 fluorophore 處於激發態時，會與 quencher 碰撞而產生碰撞效應。另外處於自然態 (Native state) 的蛋白質其 Tryptophan 處於分子內，其擴散係數 (diffusion coefficient) 較自由狀態下的 Tryptophan 小，所以不容易與 quencher 接觸產生較小的淬熄效應。

靜態淬熄效應 (static quenching)：Fluorophore 處於激發態時，會與 quencher 形成錯合物 (Complex)[22,170,171]，錯合物的形成易造成螢光強度降低。然而在靜態效應中，未與 quencher 結合的 fluorophore 仍然會放出螢光。

2-12 感應耦合電漿原子發射光譜法 (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry, ICP - AES)

ICP-AES 的基本原理乃是利用 ICP 產生之高溫可達 6000K，破壞吸入樣品使其產生離子狀態，該離子裂碎物再進入質譜儀偵測。由於高溫，形成離子主要為原子態之離子，或與基質結合之離子。ICP-AES 為一種以感應耦合高頻電漿為光源之原子發射光譜裝置(圖 12)，其感應耦合高頻電漿激發源(圖 13)，由三支同心軸石英管所組成。

高頻電漿激發源向耦合線圈提供高頻能量，等離子炬管置於耦合線圈中心，內通冷卻氣、輔助氣與載氣，於炬管中產生高頻電磁場。以微電火花引燃，讓部分氬氣電離產生電子與離子。電子於高頻電磁場中獲得高能量，經碰撞將能量轉移給氬原子，使之進一步電離產生更多電子與離子。該過程像雪崩似進行時，導電氣體受高頻電磁場作用，形成與耦合線圈同心之渦流區。強大之電流產生高熱將氣體加熱，從而形成火炬形狀之可自持電漿。試樣氣溶膠通過溫度較低之中心通道，故不易擴散至 ICP 火焰周遭而產生自吸收冷蒸氣層。試樣由載氣引入霧化系統進行霧化，以氣溶膠形式進入軸向通道，於高溫與惰性氬氣氛中，氣溶膠微粒被充分蒸發、原子化、激發與電離。被激發原子與離子發射原子譜線與離子譜線，分光檢測系統將各待測元素發射之特徵譜線經分光、光電轉換與檢測，經數據處理系統對實驗數據進行處理打印輸出。

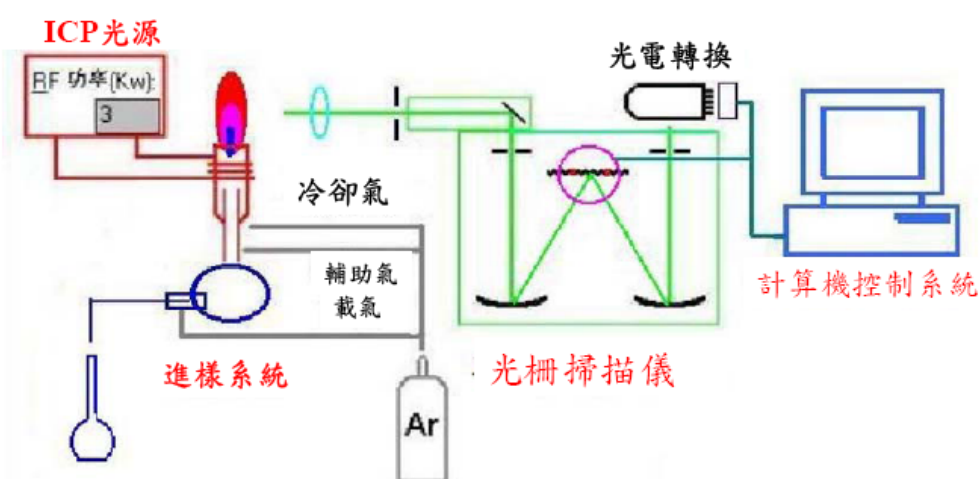


圖 12 ICP-AES 架構原理圖

ICP-AES 為一種以感應耦合高頻電漿為光源之原子發射光譜裝置。由高頻電漿激發源、等離子炬管、進樣系統、分光系統、測光系統與數據處理系統組成。1.進樣系統裝置：利用氬氣進入

霧化器中產生交錯的氣流，將樣品霧化成微細分散液滴，再帶入電漿中，另外也可藉由超音波霧化器將液體變成氣懸膠。2.高頻電漿激發源：由內中外三層同心圓石英管組成，分別氬氣分別由三層石英管下端輸入，外層石英管以切線方向通入，這些氬氣盤旋而上，一方面冷卻外層石英管的內壁及將電將限制在管中心，另一方面也是主要的支撐氣流，中層石英管為輔助氣流，中心則為載送霧狀試樣、粉末或氣體的載送氬氣流。電將在石英管上方開口處形成，這些開口處繞以感應線圈，當感應線圈通入電流時，線圈周圍產生感應磁場，其磁力線垂直於石英管。使石英管內充滿氬氣，再以一個 Tesla Coil 在氬氣內引發電子或離子，便會使得氬氣在一瞬間大量游離，產生高溫電漿。3.光柵掃描器：測量大量元素的發射譜線強度。4.光電轉換器：光電倍增管。

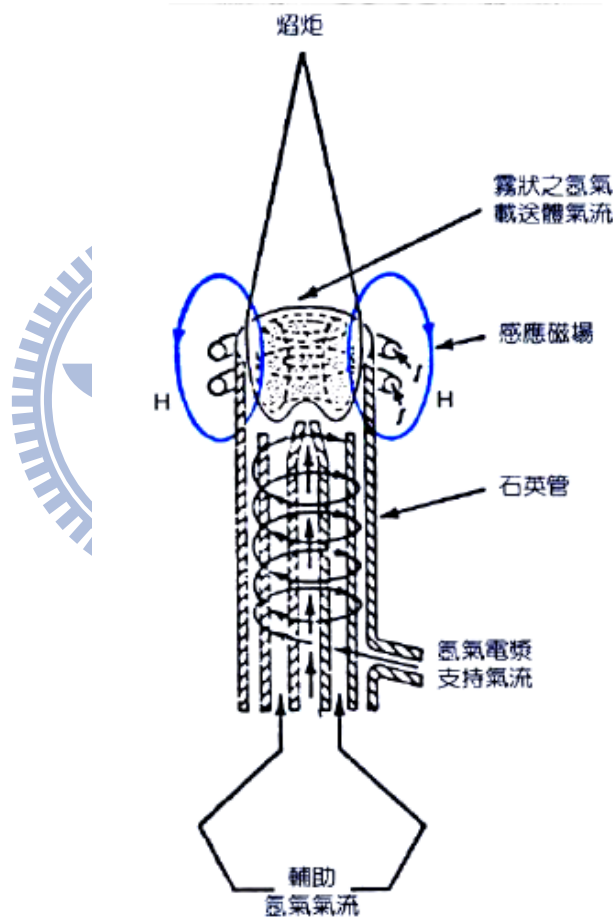


圖 13 感應耦合電漿激發源之構造示意圖

依序分為外層管(outer tube)、中層管(intermediate tube)與內層管(inner tube)；並於電漿火炬(torch)之外圍環繞與高頻產生器(high-frequency generator)連接之感應線圈(induction coil)。

2-13腸激酶 (Enterokinase, EK) 酵素切割

腸激酶 (Enterokinase, EK, EC 3.4.21.9) 是高活性高純度的絲胺酸蛋白酶(serine protease)，又是一種切割位點專一性高的蛋白酶，EK 辨認 Asp-Asp- Asp-Asp-Lys (DDDDK)之氨基酸序列，並在帶有辨認序列的融合蛋白的離氨酸殘基(Lys residue) 的 C 端切割多胜肽。其酵素活性為，一個活性單位在 37 °C 條件下，20 分鐘將 20 μg 胰蛋白酶原 (Trypsinogen) 90 % 轉化為胰蛋白酶 (Trypsin)所需的酶量。而 MTekGFP 上有 Enterokinase 的切點，可以利用 Enterokinase 分離融合蛋白質內的兩分子，做為兩分子間的距離對於 FRET 效應的變化。



第三章實驗方法

3-1 實驗材料的製備

3-1.1 重組蛋白質 pET200-MTGFP 及 pET200-MTekGFP 基因鑑定

目的:

pET200-MTGFP 及 pET200-MTekGFP 的 *E.coli*(BL21(DE3)) 菌株是由實驗室前人(蔡娟美小姐)建立的，但因為此菌株長期保存在-80°C 冰箱，所以要確認並沒有因為長期保存，造成質體被踢出或質體中有基因突變等問題，所以利用(1) PCR 加上 DNA 電泳確認重組蛋白質片段大小 (2) 重組蛋白質的 DNA 定序。

MTGFP 及 MTekGFP 重組蛋白的介紹：

MTGFP 及 MTekGFP 其 DNA 序列上幾乎完全相同,只差別在 MTekGFP 的 DNA 序列比 MTGFP 多一個 enterokinase 的切位在 MT 及 GFP 之間。

流程:

pET200-MTGFP 及 pET200-MTekGFP 的 *E.coli*(BL21(DE3)) 菌株→挑單一菌落→聚合酶連鎖反應(Polymerase Chain Reaction,PCR)與瓊膠電泳(Agarose Gel Electrophoresis)確認 DNA 分子量→DNA 定序。

方法:

PCR 首先利用 PCR (polymerase chain reaction) 的方式，確認重組蛋白質 (MTGFP 及 MTekGFP) 的基因是否有存在質體當中。利用已經接上重組蛋白質基因的菌株當做 PCR 的模版 (template)，利用 T7 forward primer 引子及 T7 reverse primer

DNA 定序: 由於 MTGFP 及 MTekGFP 的 DNA 長度分別為 999 及 1011 bp，而市面上定序公司其 DNA 定序的最佳化長度為 700-750 bp，接近或超過此長度時即建議利用 Forward primer 及 Reverse primer 做 DNA 序列兩端的定序提升增加準確性。

實驗步驟:

首先解凍含 pET200-MTGFP 及 pET200-MTekGFP 重組蛋白菌種(*E.coli* BL21(DE3))，利用養菌棒清沾菌液，取含 Kanamycin 的培養皿四區畫線，挑出單一菌落，再將挑出的單一菌落，再做一次畫線增加其產量，做為 PCR 反應的 template，進行 PCR 反應，之後跑 DNA 膠鑑定再定序送件。

3-2 蛋白質的小量表現與蛋白質的大量表現

目的:

將重組蛋白質的基因利用大腸桿菌 (*E. coli*) 的表現系統 BL21(DE3) 表現 MTGFP 及 MTekGFP 蛋白質。

方法:

利用 BL21(DE3) *E. coli* 菌株大量複製帶有要表現 MTGFP 及 MTekGFP 基因片段的 pET200 質體，並在 37 °C 環境下以 IPTG 誘導 *E. coli* 大量表現蛋白質，最後因為長時間誘導 (16 小時) 形成蛋白質結構錯誤的內涵體 (inclusion body)。待細菌培養適當時間之後再用物理性破壞方式來把細胞打碎以得到所需要的蛋白質。利用誘導大腸桿菌產生蛋白質內涵體的優點有：(1)細菌生長快速。(2)蛋白質產量極高。(3)蛋白的純度也相對較高。

實驗步驟:

蛋白質小量表現:

將之前製備好的 MTGFP 及 MTekGFP 儲存菌株(stock)，取出 20 μ l 菌液加入 3ml 含有抗生素(Kanamysine, 20g/ml)的 LB 中，於 37°C 震盪培養 16hr，使菌株活化。

蛋白質大量表現:

接著從活化的菌株中取出 250 μ l 菌液，加入含有 250ml LB 的培養錐形瓶中，同樣在 37°C 中震盪培養 4 小時，之後加入 IPTG (最終濃度為 1mM) 再繼續培養 16 小時。將培養好之菌液以 9000 rpm,於 4°C 下離心 3 分鐘得到沈澱的菌體，此菌體再去破菌，即可得到 MTGFP 及 MTekGFP 的內涵體。

3-3 蛋白質純化

3-3.1 破菌

目的:

利用破菌後得到蛋白質，而本實驗所要的蛋白質為不溶解的蛋白質，故利用蛋白質溶解度的特性，最為蛋白質初步純化。

實驗步驟:

- 1.將菌體以少量的含 Pefabloc 的去離子水將菌懸起。
- 2.將菌液放入破菌機(constant cell disruption systems)中，以壓力 28 kpsi 進行破菌。
- 3.將破菌後之溶液以 9000 rpm,於 4°C 下離心 10 分鐘，將破菌後上清液(supernatant)及不溶水的內涵體(inclusion body)沉澱分開收集。(破菌完全的 inclusion body 會呈現白色；黃色或綠色表示菌沒有破完全；夾雜黑色是破菌機中的 O-ring)
- 4.開始清洗 inclusion body

- 4-1.用去離子水均勻打散使 inclusion body 旋起
- 4-2.19000 rpm 4°C 下離心 10 分鐘，倒掉液體部分(要觀察液體是澄清或渾濁)
- 4-3.重複 step 4-1 & step 4-2，直到液體呈現澄清狀態。
- 5.直到離心後的上清液接近澄清透明，此時代表已將沈澱物中雜質清洗乾淨，
- 6.取適量的上清液及沈澱物進行 SDS-PAGE 分析。

3-3.2Gel filtration

目的:

將 MTEK GFP 蛋白質經由酵素切割後，利用 Superdex 200 XK16/40 的 column 分離實驗所需要的 GFP 蛋白質。

實驗步驟:

1. 將 Enterokinase 酵素處理後的 MTEK GFP 蛋白質，離心並且將換置於 PBS pH 7.4 的緩衝液中，利用 0.22uM 過濾膜過濾樣品之後抽氣大約 10 分鐘。
2. 配置 PBS pH 7.4 的緩衝液，利用 0.45uM 的過濾膜過濾抽氣，再將 Superdex 200 XK16/40 的 column 內的緩衝液換置到 PBS pH7.4 的環境中。
3. 將電腦與機器連線，將樣品經由注射閥進入 Superdex 200 XK16/40 的 column 中，並且開始紀錄及收集。

3-4西方墨點法(Western)

目的:

利用專一性抗體來辨認目標蛋白質

方法:

將蛋白質以 SDS-PAGE 的電泳分析蛋白質分子量位置，再轉印到 PVDF 纖維膜上，再利用抗體進行冷光呈像。

材料配方:

TBS 配方：0.5 M Tris-HCl pH7.4，0.15 M NaCl

TBST 配方：0.5 M Tris-HCl pH7.4，0.15 M NaCl，0.1 % Tween 20

實驗步驟:

- 1.活化 PVDF 膜: 利用 100% 甲醇浸濕 PVDF 膜，因為 PVDF 本身為疏水性，藉由甲醇可活化 PVDF 膜上的正電基團，使其更容易跟帶負電的蛋白質結合。
- 2.將活化後的 PVDF 用二次水清洗掉甲醇後，泡入轉印的緩衝液(transfer buffer)中保濕靜待使用。
- 3.將 3M 的圖畫紙也泡入轉印的緩衝液(transfer buffer)中保濕靜待使用。
- 4.等 SDS-PAGE 已經依照蛋白質分子量大小將蛋白質分開後，即可進行轉印。

5. 放置順序: 圖畫紙(兩張) → 轉印膜 PVDF → SDS-PAGE → 圖畫紙(兩張)。
6. 通電時間 100mA, 100 分鐘。
7. 取出轉印完成的 PVDF (注意正反面), 置入含有 5% 牛奶的 TBS buffer, 25°C 搖晃 blocking 2 小時。
8. 在含有 1% 牛奶的 TBST buffer 中, 加入一級抗體搖晃培養 2 小時。(一級抗體: Mouse Anti-His-tag Monoclonal Ab; Mouse Anti-GFP Monoclonal Ab; Rabbit Anti-MT polyclonal Ab)
9. 用含有 1% 牛奶的 TBST buffer 清洗 PVDF 每 2 分鐘一次, 共洗 20 次。
10. 在含有 1% 牛奶的 TBST buffer 中加入二級抗體搖晃培養 1 小時。(二級抗體: Goat Anti-Mouse IgG-HRP; Goat Anti-Rabbit IgG-HRP)
11. 使用含有 1% 牛奶的 TBST buffer 清洗 PVDF 每 2 分鐘一次, 共洗 20 次。
12. 利用 TBS buffer 清洗 PVDF 將 Tween-20 洗淨
13. PVDF 避光加入冷光試劑即刻進行壓片。

3-5 蛋白質摺疊(Protein folding)

目的:

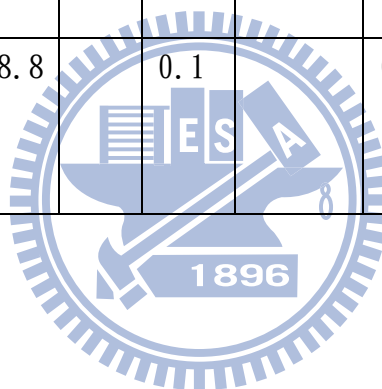
將摺疊結構錯誤的蛋白質利用物理方法將其結構解開, 再緩慢進行摺疊, 使其摺疊回自然態(Native state)。

實驗步驟:

1. 將透析膜放入 0.1M 的乙二胺四乙酸 (EDTA) 水溶液, 再用熱水煮沸 5 分鐘, 再取出膜後再用二次水清洗透析膜上殘留的 EDTA。
2. 將內涵體用變性藥劑溶解後, 在 4°C 下劇烈攪拌 12 小時, 然後用 0.22µm 過濾膜去過濾蛋白質樣品, 再將蛋白質樣品裝入只允許小於 3kD 的蛋白質通過的透析袋內, 並將半透膜置放於 2.5L 的摺疊緩衝溶液 (Refolding Buffer) 中, 依照階段性熱平衡透析法的條件(表 5), 確實的置換緩衝液, 並收集每個階段的蛋白質摺疊中間體, 進行一些分析測量其結構變化。

表 5 階段性熱平衡透析法的變性藥劑和蛋白質摺疊緩衝液的化學成分

步驟名稱	配方								
	Tris Buffer (mM)	pH	Urea (M)	β -ME (mM)	Mannitol (%)	Pefabloc (μ M)	Metal Cd ²⁺ (μ M)	時間 (小時)	置換次數
Denature Buffer	10	11	4.5	100	0.1	0.5		12 小時	溶解蛋白質
Folding buffer,R1	10	11	2	0.1	0.1	0.5	10	24 小時	2
Folding buffe,R2	10	11	1	0.1	0.1	0.5	10	12 小時	2
Folding buffe,R3	10	11		0.1	0.1	0.5	10	12 小時	2
Folding buffe,R4	10	8.8		0.1	0.1	0.5	10	12 小時	2
Folding buffe, R5 -1	10	8.8		0.1		0.5	10	12 小時	1
Folding buffe, R5 -2 (Native buufer)	10	8.8		0.1		0.5		12 小時	2



3-6 圓二色光譜儀 (Circular Dichroism, CD)

目的:

利用此儀器的近紫外光(near-UV)波段與遠紫外光(far-UV)波段，分別可觀察蛋白質的三級結構與二級結構。

實驗步驟:

- 1.將摺疊過程中每一階段透析袋內的蛋白質中間體稀釋成 0.2mg/ml，用 0.22 μ M 過濾膜去過濾蛋白質樣品。因為濃度將影響 CD 光譜的橢圓偏轉角的大小，因此對於樣品的原始濃度的量測必須特別小心。
- 2.準備摺疊過程中每一階段透析換過後緩衝溶液。
- 3.取出稀釋後的樣品 200 μ l 於 0.1cm 寬的 CD cell 中，並將循環水槽溫度設在 20 $^{\circ}$ C。
4. CD 光譜儀型號為 AVIV-410 的其他參數設定為：
wavelength range 為 300~180 nm，Band width 為 1.00 nm，Temp. Setpoint 為 25.00 deg C，Wavelength Step 為 1.00 nm，Averaging Time 為 3.000 seconds。
- 5.實驗過程中若燈壓(high tension, HT)訊號超過 800 時，會影響樣品吸收偏極光的程度，所以結果不可信，因此要立即停止實驗重新調整參數。
- 6.實驗結果為 molar ellipticity $[\theta]$ (單位： $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmole}^{-1}$) [172]，並利用程式 SELCON3[173]去分析蛋白質的二級結構比例。

3-7 動態光散射儀 (Dynamic Light Scattering, DLS)

目的:

分析蛋白質摺疊中間體的分子粒徑大小分佈情況。

實驗步驟:

- 1.使用 DLS 為型號 BI-200S，Brookhaven Instruments Corporation (紐約，美國)。
- 2.蛋白質樣品的濃度：1 mg/ml。(實際上蛋白質的濃度可依照光線打到蛋白質後，其對散射光程度做調整，並取 2 mL 的樣品置放於透明試管中。)
- 3.動態光散射儀以波長 532 nm 氬離子雷射，訊號接受器則由測角器固定於 90 $^{\circ}$ 角，腔體內溫度由循環水槽控制在 20 $^{\circ}$ C，最後將試管至於儀器的樣品槽中，即可透過儀器的軟體進行粒徑大小的偵測。

3-8 感應耦合電漿原子發射光譜法 (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry, ICP - AES)

目的:

利用 HORIBA JOBIN YVON 出產的 ICP - AES，型號: ULTIMA 2000 的機器，應用在測量蛋白質內金屬的含量，因為本實驗所用的 MTGFP 融合蛋白，其本身具

有金屬硫蛋白 (MT) 分子，若融合蛋白質有摺疊回自然態就會有螯合金屬的功能。用 ICP-AES 去測量 MTGFP 融合蛋白其 Fe、Mn、Zn、Pb、Cd、Cu、Ni 的含量，分析透析袋內的蛋白質溶液及透析袋外置換後的緩衝液兩者金屬含量的莫爾數差，最後再與蛋白質莫爾數去做比較，因為一個金屬硫蛋白擁有 7 個金屬鍵結的位置，所以可利用此特徵推測金屬與蛋白質鍵解的比例。

方法：

將樣品溶在酸性溶液中，分析其水溶液中的元素，係利用高頻電磁感應產生的高溫氫氣電漿，使導入電漿中的樣品受熱而起一系列的去溶劑、分解、原子化 / 離子化及激發等反應。其分析的依據，係利用被激發的待分析元素之原子 / 離子所發射出的光譜線，經由光譜儀的分光及偵測，即可進行元素之定性及定量[174]。本方法具有快速、靈敏及精密的分析特性。測定時，為補償因光譜背景值之不同所導致的誤差，儀器必須具有背景校正的功能。背景校正所選定的波長，需位於待分析元素的譜線附近。一般依據光譜干擾的程度，可在分析元素譜線的左右任選一方或兩方，且此選定的位置需不受到光譜的干擾。

實驗步驟：

1. 蛋白質樣品的前處理：將透析袋內待測 M5 的蛋白質樣品，其濃度稀釋到 0.1 mg/ml，準備 10ml；而透析袋外置換過後的 R5-2 緩衝溶液也準備 10ml。
2. ICP - AES 量測重組蛋白質：委託台北縣環保局鄭銘松學長操作。

3-9 螢光光譜儀(Fluorescence Spectroscopy)

目的：

1. 分析蛋白質在摺疊的過程中，其摺疊中間體是否有逐步摺疊回自然態，主要觀察螢光能量是否有逐步增強且螢光光譜的最高峰有左移的現象。
2. 分析融合蛋白質其摺疊中間體內的兩分子是否有能量轉移的現象，所以選用能激發 MT 蛋白質的激發光，若有 FRET 產生的話，MT 釋放的光會去激發 GFP，使 GFP 放出螢光。

方法：

1. 利用 280 nm 的激發光，激發苯環胺基酸，觀察摺疊蛋白質摺疊回自然態。
2. 掃描 3D 全光譜時，發現 MT 與 GFP 都有特有的螢光基團，利用此光譜的特徵，尋找到 310 nm 是一個可以分析 MTGFP 蛋白是否會有 FRET。

實驗步驟：

1. 螢光儀的機型為 Hitachi 公司 F-7000。

2. 將 MTGFP 蛋白質摺疊中間體的定量濃度到 0.2mg/ml，再利用 280 nm 的激發光觀察 MTGFP 蛋白質摺疊中間體是否有逐步摺疊回自然態
3. 將純 MT 蛋白質與純 GFP 蛋白質定相同莫爾濃度到 60 mM，掃描 3D 全光譜，觀察是否有特殊的螢光基團。
4. 將純 MT 蛋白質、純 GFP 蛋白質及 MTGFP 蛋白質的各摺疊中間體皆定量濃度到 60 mM，利用激發光 310 nm 觀察是否有 FRET 現象產生。

3-10 Enterokinase 酵素切割

目的:

將 MTekGFP (原本的 MTGFP 蛋白質在 MT 及 GFP 之間多一個 enterokinase 的切位) 的自然態蛋白質利用 Enterokinase 破壞融合蛋白的結構(圖 14)，使 MT 及 GFP 兩分子被分開，觀察螢光的變化。

方法:

利用 Enterokinase 專一性切割 MTekGFP 上兩個切位，可得到單獨得 MT 及 GFP。

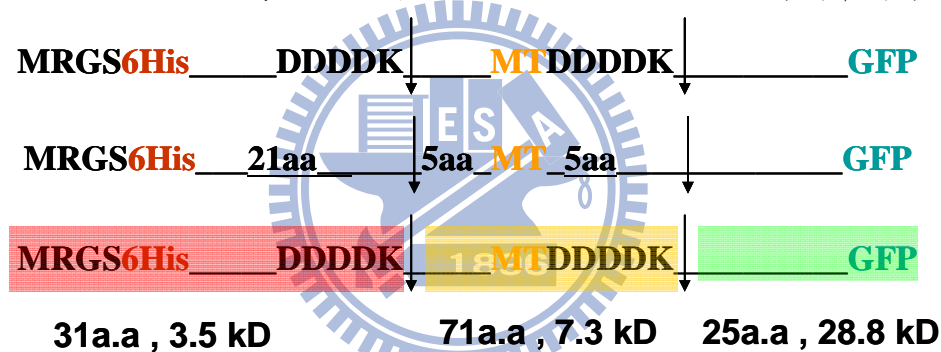


圖 14 MTekGFP 重組蛋白質內 enterokinase 的切點介紹

實驗步驟:

1. 將 MTGFP 蛋白質的濃度定量到 37.5ug
2. 酵素切割的反應條件為 37°C，16 小時，而酵素作用的濃度為 2U 開始做序列稀釋，分別是 2U、1U、0.5U、0.25U、0.125U、0U 與固定濃度的 MTGFP 蛋白質進行切割反應。
3. 反應結束後，立即跑 Native Page 觀察蛋白質切割的情形，利用 Syngene 型號 GVM20 的螢光膠臺，以波長 300 nm 分析 MTGFP 螢光現象。而剩餘的樣品以 100°C 煮 5 分鐘去活化終止酵素反應。
4. 利用圖片分析軟體，計算酵素切割後的 MTGFP 蛋白質其螢光變化。

第四章 實驗結果

4-1 基因鑑定

4-1.1 重組蛋白質 pET200-MTGFP 及 pET200-MTekGFP 基因鑑定結果

重組蛋白質 pET200-MTGFP:

利用 T7 forward primer 及 T7 reverse primer 及質體當做 template 進行 PCR，起初 T7 forward primer (pET200 質體中第 209 bp) 及 T7 reverse primer (pET200 質體中第 485 bp) 在 pET200 質體上有特定辨認的基因序列，然而插入 MTGFP 的 DNA 長度為 999 bp 被包覆在其間，所以造成整段 PCR 產物長度為 1276 bp。利用 1 倍瓊膠電泳(Agrose Gel Electrophoresis) 確認我們所保存菌株其重組基因序列大小為 999 bp (圖 15，圖 16)。此外將 MTGFP 菌株做 DNA 定序，確認是否有突變的狀況，定序用 ABI 3730XL DNA Analyzer，而序列比對則用 NCBI (National Center for Biotechnology information) 的 BLAST 功能，從比對的結果來看，與資料庫中 MT 及 GFP 序列完全相同，所以能確認所保存的菌株為基因正確的 MTGFP 菌株。

重組蛋白質 pET200-MTekGFP:

利用 T7 forward primer 及 T7 reverse primer 及質體當做 template 進行 PCR，起初 T7 forward primer (pET200 質體中第 209 bp) 及 T7 reverse primer (pET200 質體中第 485 bp) 在 pET200 質體上有特定辨認的基因序列，然而插入 MTekGFP 的 DNA 長度為 1011bp 被包覆在其間，所以造成整段 PCR 產物長度為 1288bp。利用 1 倍瓊膠電泳(Agrose Gel Electrophoresis) 確認我們所保存菌株其重組基因序列大小為 1011bp (圖 15，圖 17)。此外，並將 MTekGFP 菌株做 DNA 定序，確認是否有突變的狀況，定序用 ABI 3730XL DNA Analyzer，而序列比對則用 NCBI(National Center for Biotechnology information) 的 BLAST 功能，比對的結果與資料庫中 MT 及 GFP 序列完全相同，所以能確認所保存的菌株為基因正確的 MTekGFP 菌株。

4-1.1.1 PCR 結果：

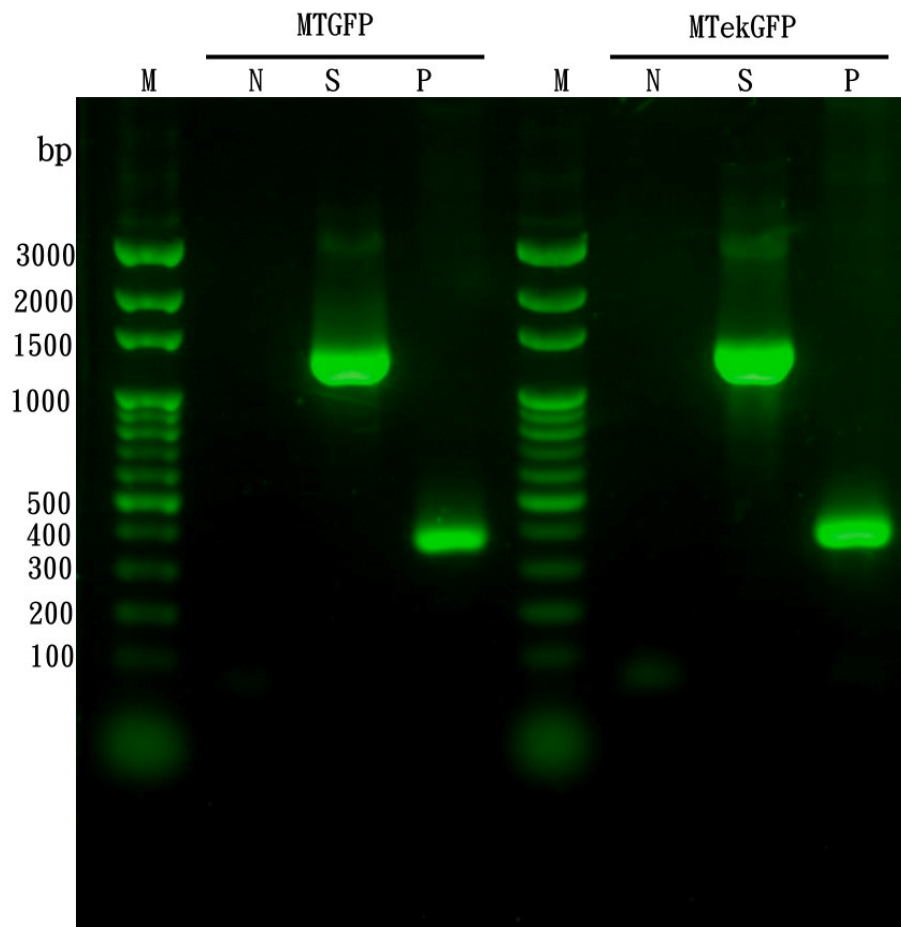


圖 15 pET200-MTGFP 及 pET200-MTekGFP 其 PCR 產物做 DNA 電泳分析

N 指 Native Control, S 指 MTGFP (1276 bp) 及 MTekGFP (1288 bp), P 指 Postive control (pET30a , 370bp).

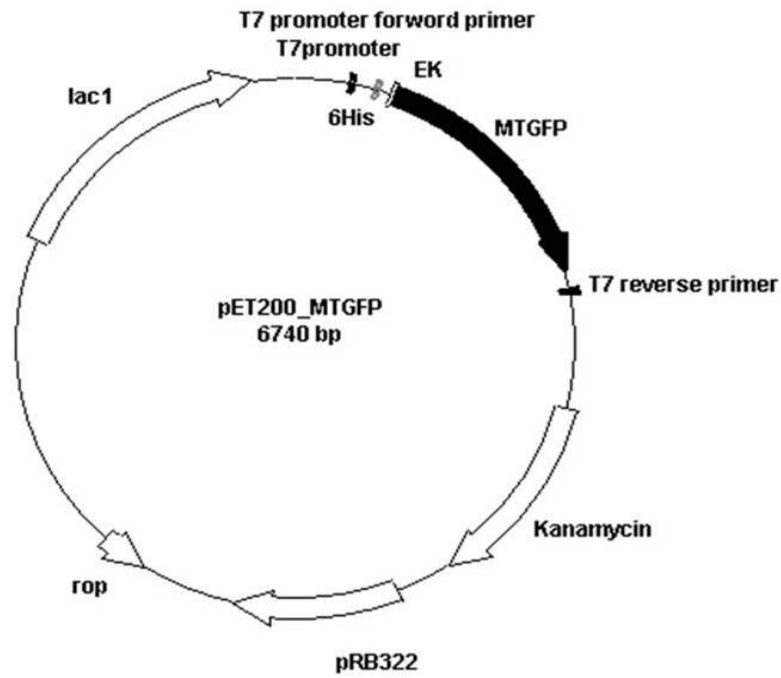


圖 16 pET200-MTGFP 質體建構圖

MTGFP 基因全長 999 bp, 轉殖到 pET200/D-TOPO vectors (5741 bp), 最終轉殖後的 pET200-MTGFP 長度為 6740 bp。EK: 為 enterokinase 的切位。

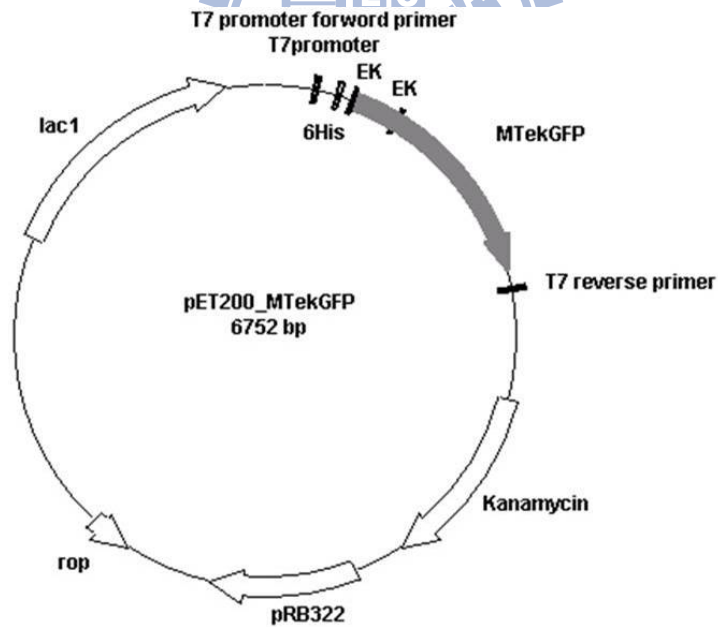


圖 17 pET200-MTekGFP 質體建構圖

MTekGFP 基因全長 1011bp, 轉殖到 pET200/D-TOPO vectors (5741 bp), 最終轉殖後的 pET200-MTGFP 長度為 6752 bp。EK: 為 enterokinase 的切位。

4-1.1.2 MTGFP DNA 定序結果:

將 T7 forward 及 reverse primer 定序後的結果，合併擷取訊號強度為可信值的地方。

1. **AGAAGGAGAT**:指 RBS 序列
2. **CATCATCATCATCATCAT**:指 His tag 序列
3. 紅色字:指 Enterokinase 序列(**GATCT...TAAG**)
4. 黃色背景的文字:指 MT 序列(**ATGGAC...TGCGCC**)
5. 綠色背景的文字:指 GFP 序列(**ATGGCTA...CTCTACAAA**)

ACCAATTTTCACTCTAAGAAATAATTTTGTTTAACTTTA**AGAAGGAG**
ATATACATAT**GC**GGGGTTCT**CATCATCATCATCATCAT**GGTATGGCT
AGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGG**GATCTGTACGACGATG**
ACGATAAGGATCATCCCTTCACC**ATGGACCCCAACTGCTCCTGTGCT**
ACAGATGGATCCTGCTCCTGCGCTGGGTCTTGCAAATGCAAAGAGTG
CAAATGCACCACCTGCAAGAAAAGCTGCTGCTCCTGCTGCCCGGTGG
GCTGTGCGAAGTGCTCCCGGGGCTGCGTCTGCAAAGAGGCTTCGGAC
AAGTGCAGCTGCTGCGCCAAAGGGCAATTCTGCAGATATCCAGCACA
GTGGCGGCCGCTCGAGTCTAGAA**ATGGCTAGCAAAGGAGAAGA**ACTT
TTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTTGAATTAGATGGTGATGTTAAT
GGGCACAAATTTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCTACATA
CGGAAAGCTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACTACCTGT
TCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTCTCTTATGGTGTTCAATGCTT
TTCCCGTTATCCGGATCATATGAAACGGCATGACTTTTTCAAGAGTGC
CATGCCCGAAGGTTATGTACAGGAACGCACTATATCTTCAAAGATG
ACGGGAACTACAAGACGCGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATAC
CCTTGTTAATCGTATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATG
GAAACATTCTCGGACACAACTCGAGTACAACTATAACTCACACAAT
GTATACATCACGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGCTAACT
TCAAAATTCGCCACAACATTGAAGATGGATCCGTTCAACTAGCAGAC
CATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCCTTTTACCA
GACAACCATTACCTGTGACACAATCTGCCCTTTCGAAAGATCCCAA
CGAAAAGCGTGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTTGTAACTGCTGCTG
GGATTACACATGGCATGGATGAGCTCTACAAATAATGAATTAAACCC

GCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTAAGGGCGAGCTCAACGAT
CCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGAAGCTAGAGA

4-1.1.3 MTGFP protein 定序結果

主要是由 DNA 定序結果，利用軟體將 DNA 翻譯成 protein。

- 1.紅色背景文字:指 His tag 蛋白質序列(HHHHHH)
- 2.藍色字體：指 Enterokinase 切位序列 (DDDDK)
- 3.黃色背景的文字：指 MT 蛋白質序列(MDPNC...SCCA)
- 4.綠色背景的文字：指 GFP 蛋白質序列(MASKG...DELYK)

MRGSHPHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDHPFTMDPNCSCATD
GSCSCAGSCKCKECKCTTCKKSCCSCPVGCAKCSRGCVCKEASDKCS
CCA~~KGQFCRYPAQWRPLESR~~MASKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKF
SVSGEGEGDATYGKLT~~LKFICTTGKLPVPWPTLVTTFSYGVQCFSRYPD~~
HMKRHDFFKSAMPEGYVQERTISFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIE
LKGIDFKEDGNILGHKLEYNYN~~SHNVYITADKQKNGIKANFKIRHNIED~~
GSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS~~KDPNEKRDHMLVLL~~
EFVTAAGITHGMDELYK-

4-1.1.4 MTGFP protein 定序結果分別 NCBI 資料庫比對

(a)MT alignment 結果

->Query 指 MTGFP 中的 MT 序列

->Sbjct 指 Data Base 中的 Chinese hamster metallothionein II gene 序列

->結果顯示：MTGFP 中的 MT 序列與資料庫中 Chinese hamster metallothionein II gene 的 MT 99% 結果相符。MTGFP 序列的後半段

有一個蛋白質 Arg(R)與 Chinese hamster metallothionein II gene 上的 Gln(Q)不同，但並不影響蛋白質結構與特性，此兩種蛋白質皆為極性蛋白質。

(b)GFP alignment

->Query 指 MTGFP 中的 GFP 序列

->Sbjct 指 Data Base 中 cloning vector pBAD-GFPuv 的 GFP 序列

->結果顯示：MTGFP 中的 GFP 序列與 cloning vector pBAD-GFPuv 的 GFP 結果 100% 相符。

4-1.1.5MTekGFP DNA 定序結果:

將 T7 forward 及 reverse primer 定序後的結果，合併擷取訊號強度為可信值的地方。

1. **AGAAGGAGAT**:指 RBS 序列
2. **CATCATCATCATCATCAT**:指 His tag 序列
3. 紅色字:指 Enterokinase 序列(**GATCT...TAAG**)(**GACGACGATGAC**)
4. 黃色背景的文字:指 MT 序列(**ATGGAC...TGCGCC**)
5. 綠色背景的文字:指 GFP 序列(**ATGGCTA...CTCTACAAA**)

ACCAATTTTCACTCTAAGAAATAATTTTGTTTAACTTTA**AGAAGGAG**
ATATACATATGCGGGGTTCT**CATCATCATCATCATCAT**GGTATGGCT
AGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTTCGG**GATCTGTACGACGATG**
ACGATAAGGATCATCCCTTCACC**ATGGACCCCAACTGCTCCTGTGCT**
ACAGATGGATCCTGCTCCTGCGCTGGGTCTTGCAAATGCAAAGAGTG
CAAATGCACCACCTGCAAGAAAAGCTGCTGCTCCTGCTGCCCGGTGG
GCTGTGCGAAGTGCTCCCGGGGCTGCGTCTGCAAAGAGGCTTCGGAC
AAGTGCAGCTGCTGCGCC**GACGACGATGAC**AAAGGGCAATTCTGCA
GATATCCAGCACAGTGGCGGCCGCTCGAGTCTAGA**ATGGCTAGCAAA**
GGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTTGAATTAGAT
GGTGATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGG
TGATGCTACATACGGAAAGCTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGG
AAAACTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTCTCTTATGG
TGTTCAATGCTTTTCCCGTTATCCGGATCATATGAAACGGCATGACTT
TTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAGGAACGCACTATAT
CTTTCAAAGATGACGGGAACTACAAGACGCGTGCTGAAGTCAAGTTT
GAAGGTGATACCCTTGTTAATCGTATCGAGTAAAAGGTATTGATTTT
AAAGAAGATGGAAACATTCTCGGACACAAACTCGAGTACAACTATA
ACTCACACAATGTATACATCACGGCAGACAAACAAAAGAATGGAAT
CAAAGCTAACTTCAAAATTCGCCACAACATTGAAGATGGATCCGTT
AACTAGCAGACCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCT
GTCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTGACACAATCTGCCCTTTCC
AAAGATCCCAACGAAAAGCGTGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTTGT
AACTGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAGCTCTACAAATAAT

GAATTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTAAGGGCG
AGCTCAACGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGAAGCTAGAGA

4-1.1.6 MTekGFP protein 定序結果

主要是由 DNA 定序結果，利用軟體將 DNA 翻譯成 protein。

1. 紅色背景文字:指 His tag 蛋白質序列(HHHHHH)
2. 藍色字體:指 Enterokinase 切位序列 (DDDDK)
3. 黃色背景的文字:指 MT 蛋白質序列(MDPNC...SCCA)
4. 綠色背景的文字:指 GFP 蛋白質序列(MASKG...DELYK)

MRGSHHHHHHGMASMTGGQMQGRDLYDDDDKDHPFTMDPNCSCATD
GSCSCAGSCKCKECKCTTCKKSCCSCPVGCAKCSRGCVCKEASDKCS
CCADDDDKGQFCRYPAQWRPLESRMASKGEELFTGVVPILVELDGDVN
GHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKICTTGKLPVPWPTLVTTFSYGVQCFS
RYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTISFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLV
NRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYITADKQKNGIKANFKIRHN
IEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHNV
LLEFVTAAGITHGMDELYK—

4-1.1.7 MTekGFP protein 定序結果分別 NCBI 資料庫比對

(a)MT alignment 結果

->Query 指 MTekGFP 中的 MT 序列

->Sbjct 指 Data Base 中的 Chinese hamster metallothionein II gene 序列

->結果顯示:MTekGFP 中的 MT 序列與資料庫中 Chinese hamster metallothionein II gene 的 MT 99% 結果相符。MTGFP 序列的後半段有一個蛋白質 Arg(R)與 Chinese hamster metallothionein II gene 上 Gln(Q)不同,但不影響蛋白質結構與特性,此兩種蛋白質皆為極性蛋白質。

(b)GFP alignment

->Query 指 MTekGFP 中的 GFP 序列

->Sbjct 指 Data Base 中 cloning vector pBAD-GFPuv 的 GFP 序列

->結果顯示:MTekGFP 中的 GFP 序列與 cloning vector pBAD-GFPuv 的 GFP 結果 100% 相符。

4-2 MTGFP 重組蛋白質的表現

利用大腸桿菌加入 IPTG 誘導 16 小時，使 MTGFP 蛋白質大量表現，也因為過量表現 MTGFP 蛋白質，所以造成內涵體的產生，並利用破菌機破菌，經過二次水多次重複的清洗內涵體，收集破菌後的上清液與破菌後的內涵體，進行電泳分析來確定蛋白質的純度。跑膠結果在 39 kD 左右有大量表現的蛋白質，因為 MTGFP 蛋白質分子量為 39.25 kD，所以推測應該是 MTGFP 蛋白質。

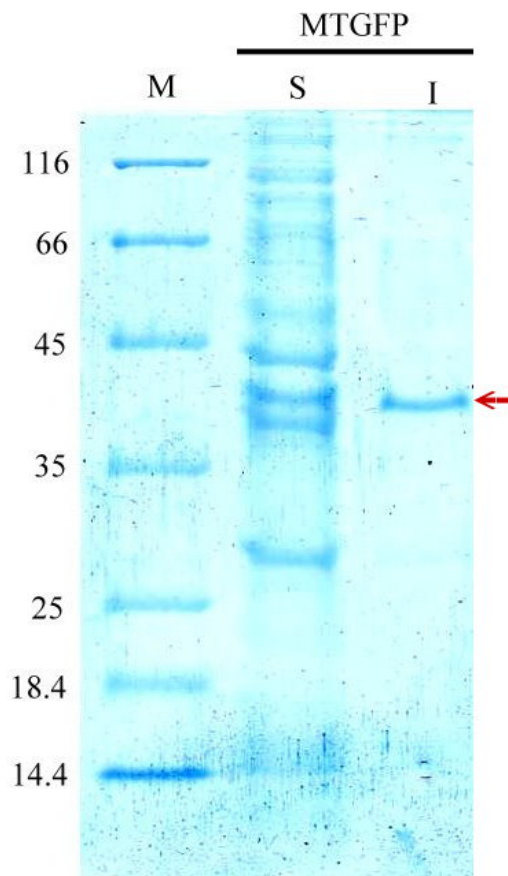


圖 18 MTGFP 之 SDS-PAGE 分析

利用 12% SDS-PAGE 確定蛋白質破菌清洗後 MTGFP 的內涵體純度的狀況。

M 代表 Marker, S 代表上清液, I 代表內涵體, 紅色箭頭標的的位置為 MTGFP 蛋白質。

4-3 Gel filtration 純化蛋白質

利用 Superdex 200 xk16/40 的 column 純化經由酵素處理過的 MTekGFP，目的是要得到純化的 GFP 蛋白質。

將酵素處理過的 MTekGFP 經由 Superdex 200 xk16/40 的 column 純化分離出 7 個小片段(fraction)，再以 SDS-PAGE 分析。將 7 個小片段(fraction)分別裝入微量離心管(Ependof)中，而第 4、5 管中可以收集到 GFP 蛋白質(圖 19、圖 20、圖 21)。再將第五管的綠色螢光蛋白樣品，再做一次 Superdex 200 xk16/40 的 column 純化，可以得到純的 GFP 蛋白質(圖 22)。

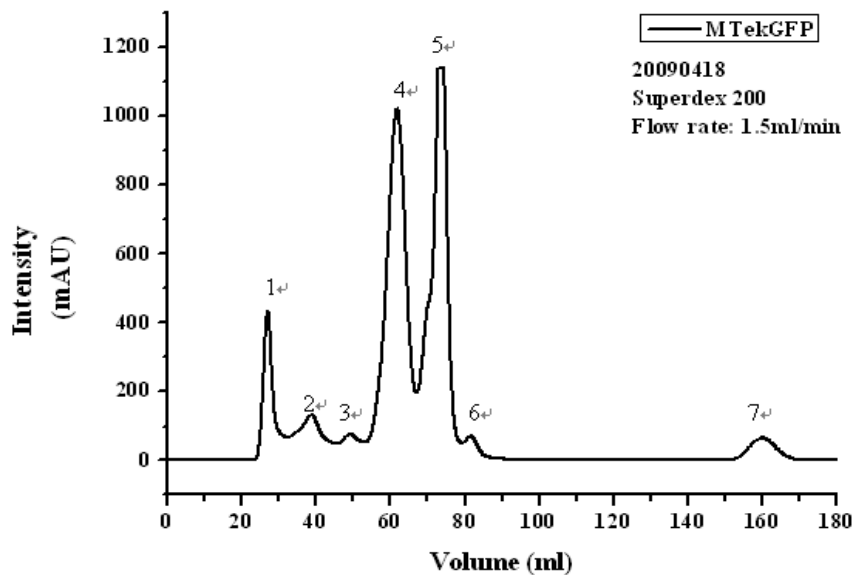


圖 19 利用 Gel filtration 方式分離 MTekGFP 的蛋白質

Superdex 200 xk16/40 的 Column 分離出 7 個 fraction (片段)跑膠確認。

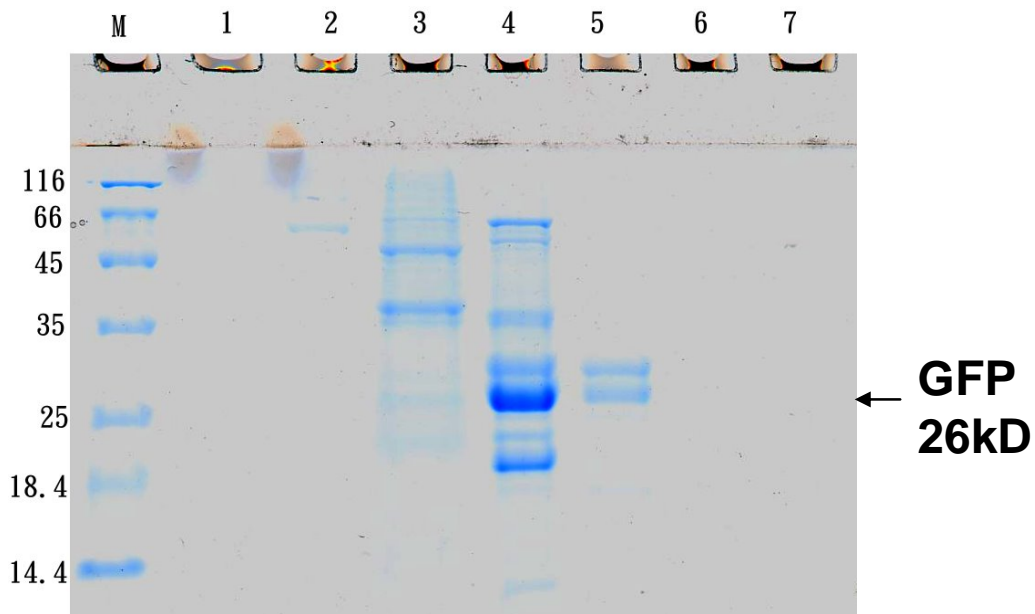


圖 20 Gel filtration (Superdex 200 xk16/40) 分離 GFP 跑膠確認圖

MTekGFP 經由酵素處理過後將 MT 與 GFP 分開，利用 gel filtration 得到純的 GFP 蛋白。

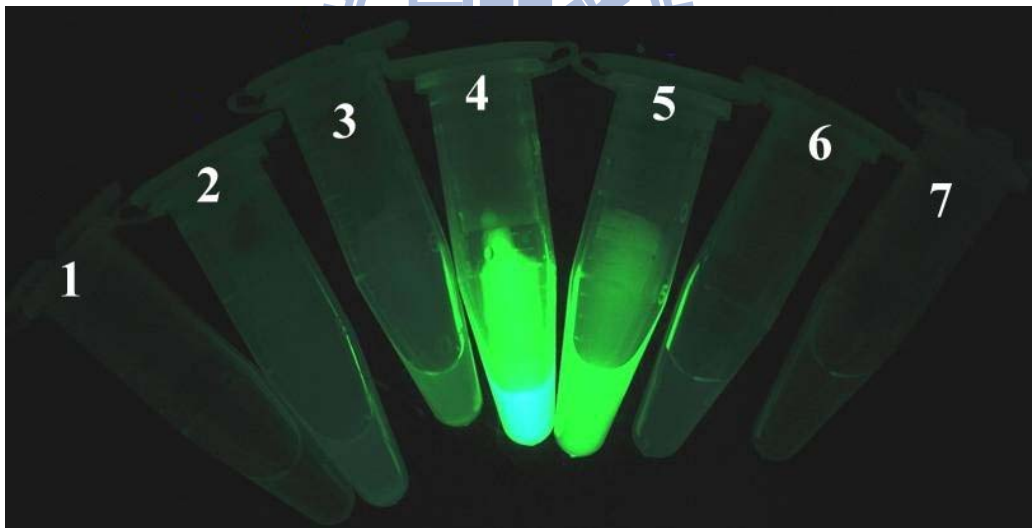


圖 21 Gel filtration (Superdex 200 xk16/40) 分離 MTeK GFP 所收集的樣品

MTeK GFP 蛋白質利用 Superdex 200 xK16/40 分離出 6 個 peak，標號 1 到 7 管對應著 gel filtration 的 peak1 到 peak 7。發出螢光的第 4-5 管內含有 GFP 的蛋白質。

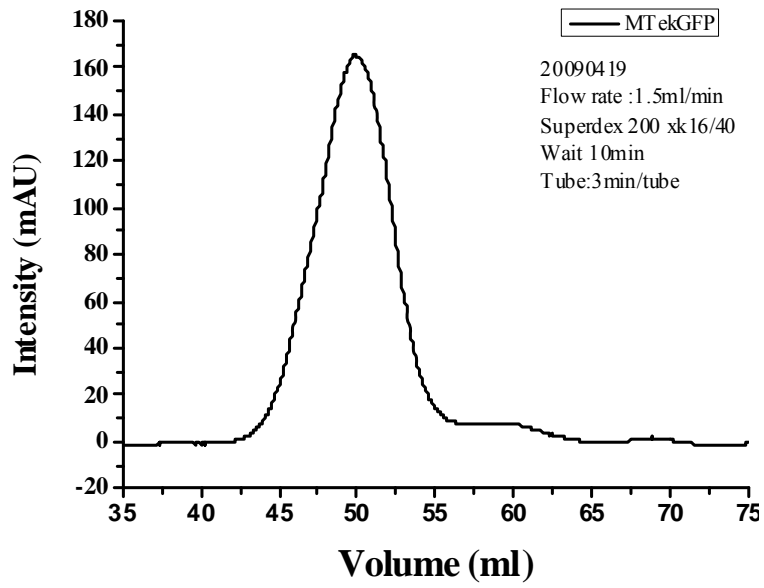
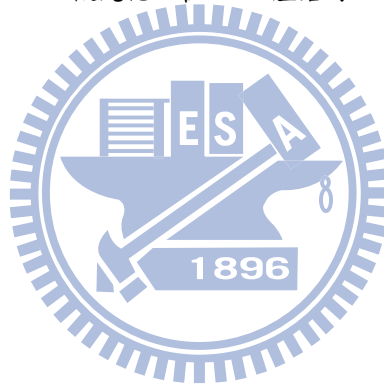


圖 22 利用 Gel filtration 來第二次純化 MTekGFP 蛋白

以 Superdex 200 gel filtration 做純化，在 50ml 左右可以得到非常純的 GFP。



4-4 西方墨點法確認 MTGFP 蛋白質

做 Western 的目的是為要證明此大量表現的蛋白質為 MTGFP。而 MTGFP 蛋白質為融合蛋白，在其 N 端具有 6 個 Histidine 的序列，其次連接 MT 蛋白質分子、最後才是 GFP 蛋白質分子，知道這些序列後，於是選用專一性抗體 rabbit-anti-MT (polyclone)、Mouse-anti-MT (Monoclonal)、Mouse-anti-His (Monoclonal)、Mouse-anti-GFP (Monoclonal) 來辨認特定序列，證明此為 MTGFP 蛋白質。取 5ul 的濃度 0.1ug/ml 的內涵體，跑 SDS-PAGE 後，將蛋白質轉印到 PVDF 膜上進行 Western Blotting 的實驗。證實我們合成之 MTGFP 蛋白質，均可為 4 種抗體辨視。

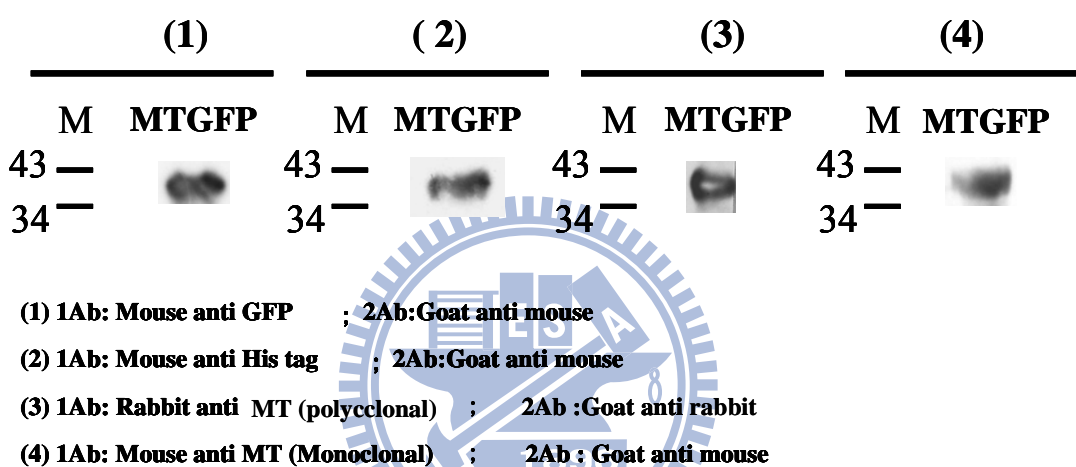


圖 23 MTGFP Western 的結果

MTGFP 經由電泳後將蛋白質轉印到 PVDF 上，先分別使用一級抗體 rabbit-anti-MT (polyclone)、Mouse-anti-MT (Monoclonal)、Mouse-anti-His (Monoclonal)、Mouse-anti-GFP (Monoclonal) 進行反應，再使用二級抗體：Goat-anti-mouse IgG-HRP 及 Goat-anti-rabbit IgG-HRP，最後再加入 HRP 的受質在 membrane 上進行呈色。紅色箭頭為 MTGFP 蛋白質的位置。

4-5 圓二色光譜儀 (Circular Dichroism, CD)測量二級結構變化

利用 CD 測量 MTGFP 蛋白質摺疊過程中，分析各個摺疊中間體 M1、M2、M3、M4 及已摺疊的 M5 進行 far-UV 的 CD 分析其二級結構變化，每一個樣品的濃度為 0.2mg/ml。掃描的波段在 190-290nm，M1(unfold state) 到 M5(native state)為 R1 到 R5 的摺疊步驟的中間態，然而各階段樣品在掃描過程中，若燈壓超過 800V 則立即停止測量，因為燈壓過高，除了傷害儀器，其數據也不可採信。將分析所得到之 CD 圖譜數據經由 SELCON3 軟體來分析蛋白質二級結構比例，分別為 distorted(d)、regular (r)、turn (Trn)、 α -helix (H)、 β -sheet(S)、 α -helix (H(d))、distorted β -sheet (S(d))、random coil (unrd)。MTGFP 此蛋白質具有 GFP 的 β -sheet 結構特徵，及 MT 的 random coil 特徵[175]。有研究指出 GFP 的二級結構中， α -helix(H) $20 \pm 1\%$ 、 β -sheet(S) $52 \pm 2\%$ 、 β -turn $16 \pm 1\%$ 、remainder $13 \pm 1\%$ [176]；而對於 MT 的 CD profile 的研究，指出 MT 與螯合金屬後在結構上會有變化，可觀察到波長 227 nm (會在附近產生正向波形)、239 nm (會在附近產生負向波形)、259 nm (會在附近產生正向波形) 等的改變[111]，在 PDB 的網站搜尋 MT-2 的結構，發現其具有 8 個 β -trun 由 4 個胺基酸組成、1 個 γ -trun 由 3 個胺基酸組成[177]。由 CD 實驗結果得知 MTGFP 其 GFP 蛋白質在 M1 並沒有完全解開結構，但隨著摺疊接近自然態時，MT 摺疊回自然態(M5)，使得 β -sheet 比例下降，而 random coil 比例提升 (圖 24、圖 25、表 6)。

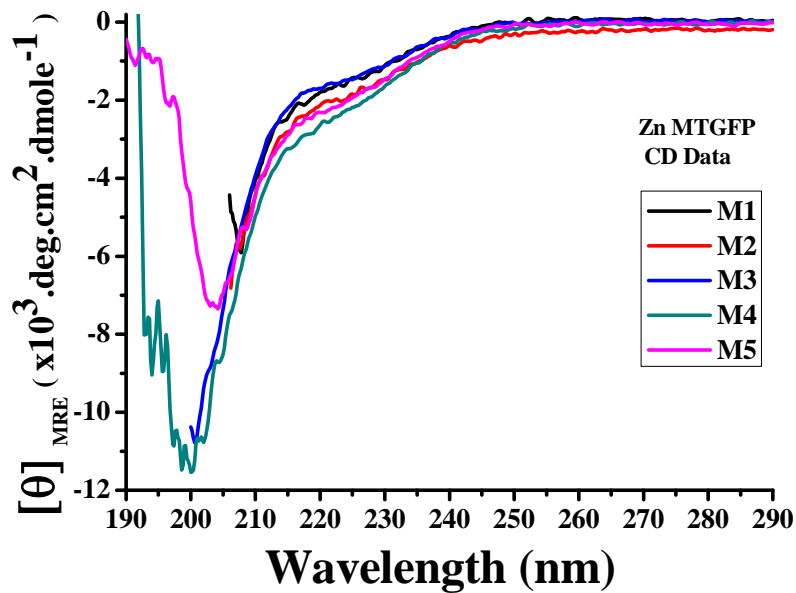


圖 24 MTGFP 蛋白質各摺疊中間體的 CD 光譜

圖中將各中間體及最終自然態(Native state)，依照摺疊順序分別命名為 M1~M4(intermediate state)、M5(native state)，並以不同顏色作為區分。

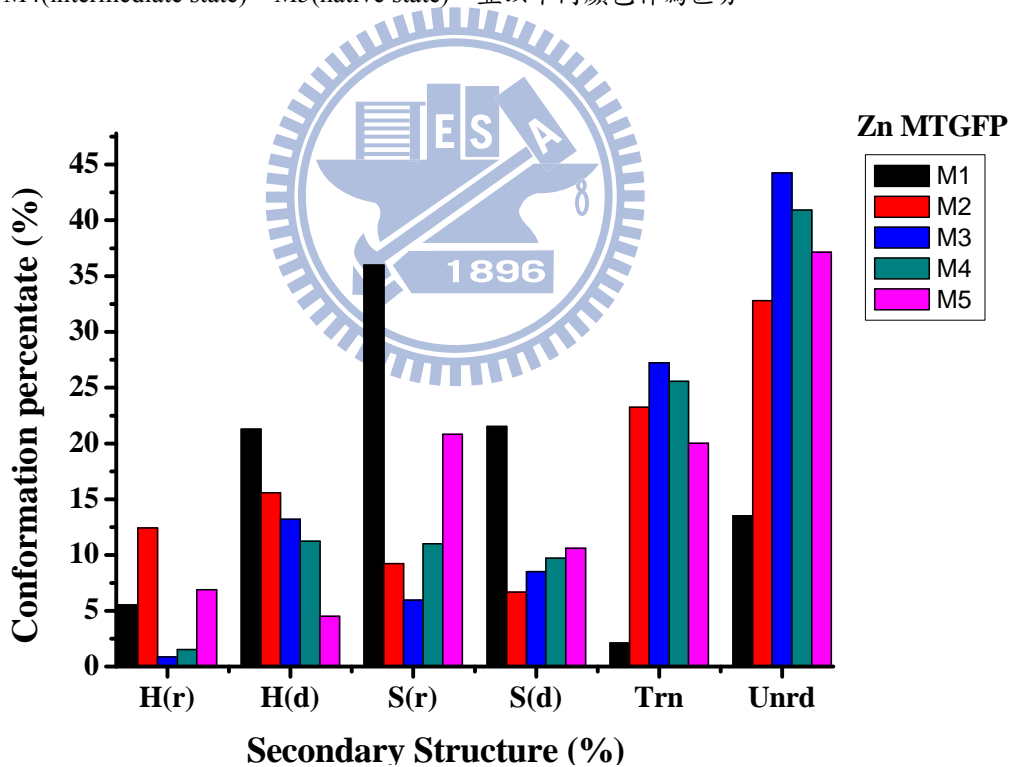


圖 25 MTGFP 蛋白質各摺疊中間體的二機結構柱狀分佈圖

將折疊中間體及自然態蛋白質以不同顏色做區分。橫軸的部份為 SELCON3 所進行分析的二級結構，縱軸的部份為各中間體所含二級結構的比例

表 6 MTGFP 蛋白質各摺疊中間體的二機結構分佈表

	H(r)	H(d)	S(r)	S(d)	Trn	Unrd
	%	%	%	%	%	%
M1	5.53	21.25	36	21.53	2.12	13.53
M2	12.42	15.60	9.24	6.69	23.25	32.80
M3	0.85	13.19	5.96	8.51	27.23	44.26
M4	1.53	11.25	11.00	9.72	25.58	40.92
M5	6.91	4.50	20.82	10.61	20.02	37.14

摺疊回到自然態的 MTGFP，其二級結構的分佈與 GFP 二級結構的分佈 [176] 有部分雷同，都是以 β -sheet 為主要分佈結構，但是因為 MTGFP 中含有 MT 蛋白質，其最主要結構為 random coil，所以 MTGFP 其 random coil (unrd) 的比例分佈會比 GFP 高。下面(圖 26)主要在講述 MTGFP M5 接近 Native state 時的二級結構比例，單獨 GFP 及單獨 MT 的二級結構比例，而 MTGFP idea 值為假設 commercial MT 和 GFP 兩蛋白質融合在一起時，依照分子量的比例分配二級結構的值。

	α -Helix (%)	β -sheet (%)	Turn (%)	Unrd (%)
MTGFP M5	11.41	31.43	20.02	37.14
GFP	20	52	16	13
MT	0	0	52.5	47.5
MTGFP idea	15.7	40.7	24.4	19.3

圖 26 MTGFP M5 與 GFP 與 MT 與 MTGFP 理想值的二級結構比較

4-6 動態光散射儀(Dynamic Light Scattering,DLS)分析粒子大小

動態光散射儀(DLS)用來分析水溶液中粒子的粒徑大小，因為蛋白質復性的過程，蛋白質結構會從鬆散變為緊密，所以蛋白質若摺疊回自然態，其蛋白質分子的粒徑也要越來越小。圖為 DLS 的 auto correlation function 經由 non-negative constrained least square(NNLS)的方法分析得到的結果(圖 27)。由 DLS 數據的結果可以瞭解 MTGFP 蛋白質在 denature buffer 下是變性而展開的情形，其有效直徑為 $12.7 \pm 0.2 \text{ nm}$ 。而其他摺疊中間體 M1-M4 在 20°C 測得有效粒徑大小分別為 $12.6 \pm 0.2 \text{ nm}$ 、 $12.4 \pm 0.2 \text{ nm}$ 、 $12.2 \pm 0.4 \text{ nm}$ 、 $11.0 \pm 0.0 \text{ nm}$ 。最後的已摺疊蛋白質 M5 的粒子大小為 $9.4 \pm 0.1 \text{ nm}$ 。藉由 DLS 的分析可以瞭解 MTGFP 透過藉由透析置換 buffer 的方式移除變性劑，然後進行摺疊且其構形上有所變化，使得我們可以觀察到蛋白質顆粒在粒徑上逐步摺疊回自然態。

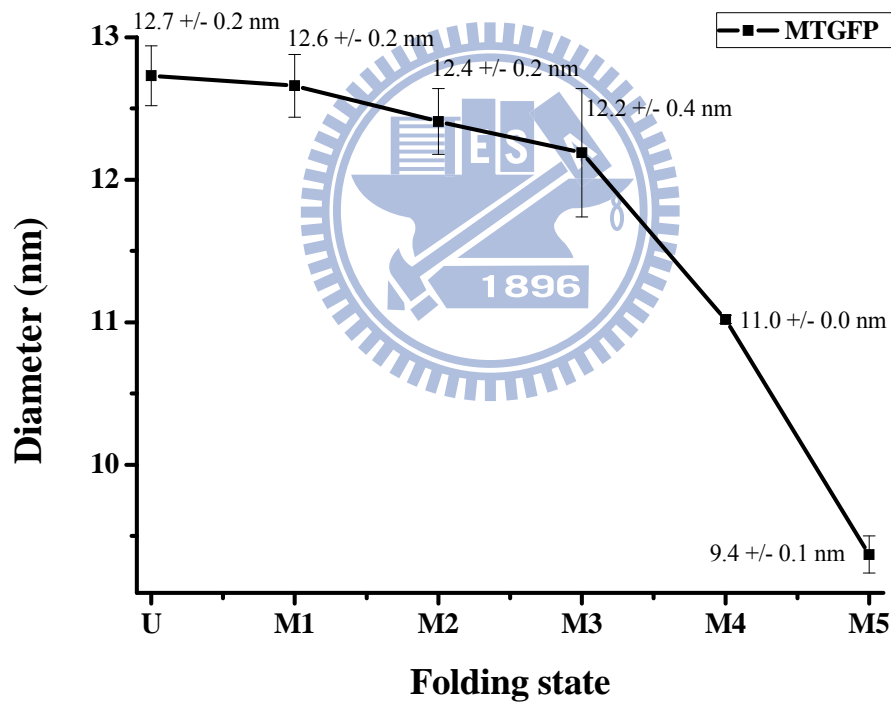


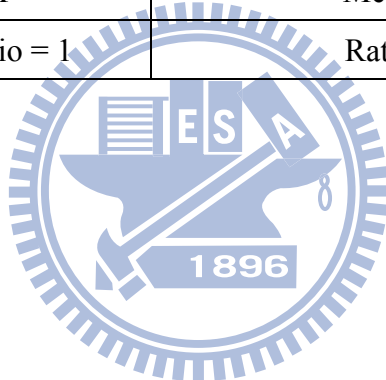
圖 27 動態光散射儀分析 MTGFP 蛋白質在各摺疊過程中分子粒徑大小分佈
發現隨著摺疊趨近自然態，蛋白質粒子也逐漸變小。

4-7 感應耦合電漿原子發射光譜法 (ICP-AES) 分析蛋白質內金屬含量

MT 蛋白質是一種會螯合金屬的硫蛋白，且一個金屬硫蛋白可以接 7 個二價過渡金屬離子，而 TGFP 蛋白質的序列中含有 MT 的序列，所以當蛋白質摺疊回自然態成為有功能的蛋白質時會與金屬結合。在摺疊的過程中，添加金屬離子幫助蛋白質摺疊，所以利用 ICP-AES 分析微量金屬元素時，要將透析袋內的蛋白質溶液及透析袋外置換後的緩衝液兩者金屬含量的莫爾濃度相扣後，再與 MTGFP 蛋白質的莫爾濃度做比較，看彼此的比例關係，進而推測一個 MTGFP 蛋白質內可以與多少的金屬螯合，算出蛋白質的硫鍵與金屬鍵解的比例。實驗所用的 MTGFP 蛋白質濃度為 254.77 μM ，將蛋白質濃度比例視為 1 時，結果顯示與 6.7 個 Zn 離子結合，因此 MT 具有生物功能。

表 7 ICP-AES 分析摺疊回自然態的 MTGFP 蛋白質金屬含量比例

MTGFP	Metal (Zn)
Protein Ratio = 1	Ratio= 6.7



4-8 利用摺疊中間物探討蛋白質之穩定度及螢光螢光蛋白的表現

4-8.1 利用螢光儀分析 MTGFP 蛋白質其疏水性核心的形成

利用激發光 280 nm 激發蛋白質內的苯環胺基酸，因為水溶性蛋白質其核心屬與比較疏水性的胺基酸，就是蛋白質結構中的芳香族胺基酸，當蛋白質摺疊越接近自然態時，芳香族胺基酸被其他構造包覆而疏水性作用力 (hydrophobic force) 增強，使芳香族胺基酸間結構越趨緊密且共振更穩定，造成原本螢光分子要釋出的能量不易以熱能的方式散出造成螢光強度增強。

觀察蛋白質摺疊過程，發現到在從未摺疊蛋白質、摺疊中間體 M1、M2、M3、M4、M5 (native state)，其螢光光譜中有兩項顯著的變化。第一：螢光強度會隨著摺疊越接近自然態而增強，強度由 500 增加到 5500；第二：各摺疊階段其螢光最高峰值有光譜藍位移現象 (blue shift)，其位移約為 14 nm (圖 28)。另外從特定螢光 (I320/365) 的波長分析蛋白質結構，證明苯環胺基酸在最疏水性 (I320 nm) 及最親水性 (I365 nm) 時，螢光光譜有藍位移現象的結果 (圖 29)。

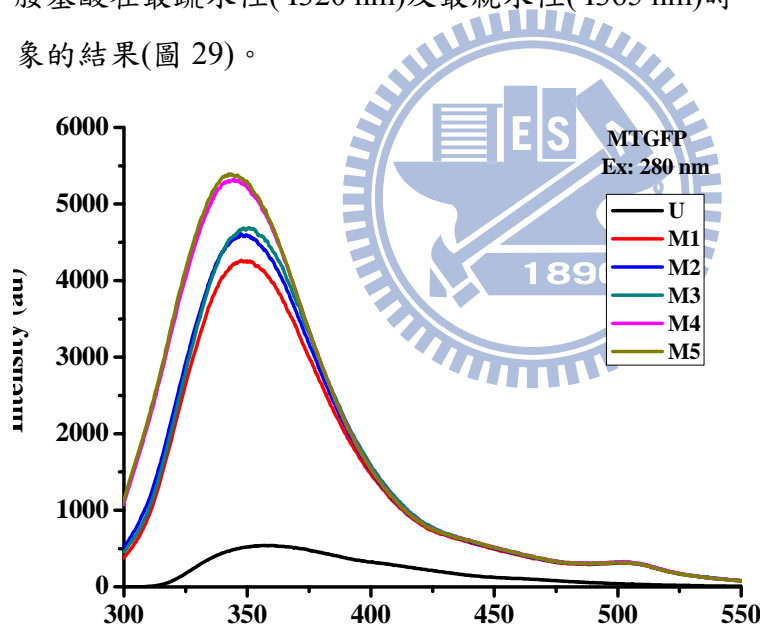


圖 28 MTGFP 摺疊過程中(激發光 280 nm)各中間體的螢光光譜

螢光激發光波長：280 nm；螢光測定波長：300~500 nm，蛋白質的螢光隨著摺疊越接近自然態而增強，且波峰也有逐漸藍位移的現象。

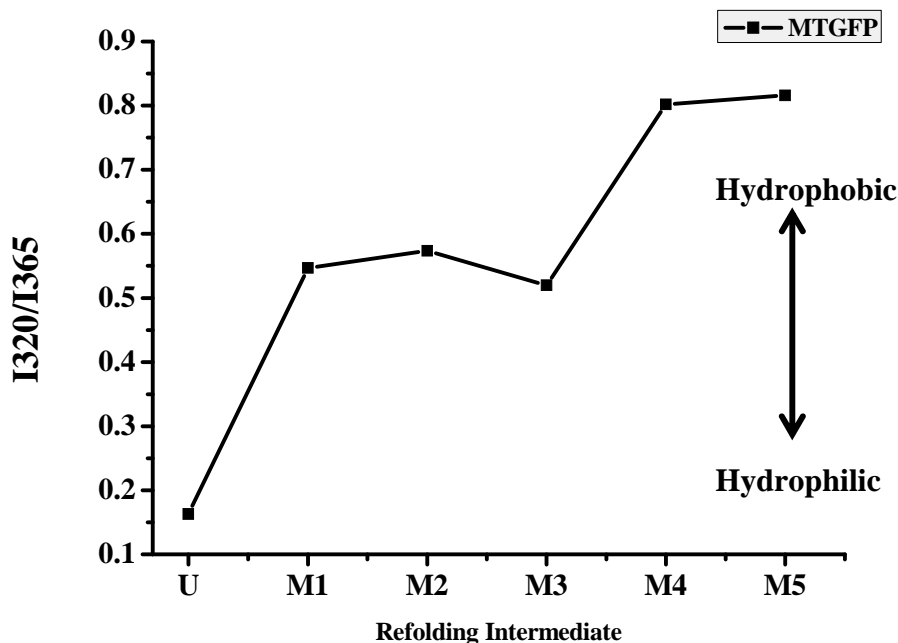


圖 29 MTGFP 在摺疊過程中螢光光譜的位移分析(I320/I365)折線圖

說明蛋白質在摺疊過程中，從未摺疊的蛋白質(U) 依著摺疊的過程，逐漸接近結構穩定的自然態時，其螢光能量螢光光譜有趨向短波長移動。

4-8.2 利用螢光儀分析 MTGFP 蛋白質觀察綠色螢光蛋白的表現

前言有介紹自然界的 GFP 蛋白質在波長 395nm 激發光下，可在 508 nm 有放射光出現；因為本研究所使用的蛋白質具有 GFP 蛋白質的發光基團，因此利用波長 395 nm 的激發光激發 MTGFP 蛋白質融合蛋白質釋出 508 nm 的螢光(圖 30)，因此利用此特徵觀察 MTGFP 在摺疊過程中，GFP 蛋白質其螢光表現，來推測 MTGFP 蛋白質內 GFP 蛋白質摺疊的狀況。從結果顯示 GFP 的螢光，在 U (unfold state) 其螢光強度最低，緊接著在 M1 state 螢光強度有顯著性的增加，但隨著摺疊接近自然態時，蛋白質螢光強度卻逐步下降。(圖 31、圖 32、圖 33、)。

基於能守恆的理論能量不會無故消失，因此不是被吸收就是被以熱能形式釋出。因此可能有某物質將 GFP 蛋白質的能量給包覆住，所以我們就推測有可能是 MT 蛋白質將 GFP 能量包覆住，或者是有螢光共振能量轉移的現象產生。

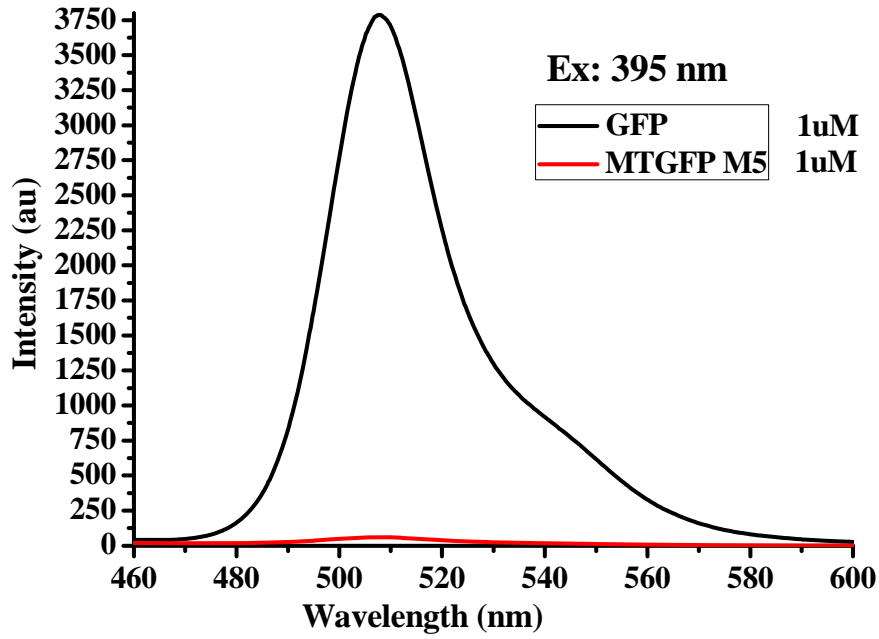


圖 30 比較相同濃度下 GFP 與 MTGFP 其(激發光 395 nm)螢光表現
 利用激發光 395 nm 去激發相同濃度(1 μ M)下的 MTGFP (M5)與 GFP 蛋白質，觀察到兩者的
 螢光放射光的最高峰值，大約都在 508 nm 左右強度，但兩者強度有非常明顯的差異。這
 張表示純 GFP 蛋白質螢光強度比 MTGFP 融合蛋白的螢光強度有很大差異。

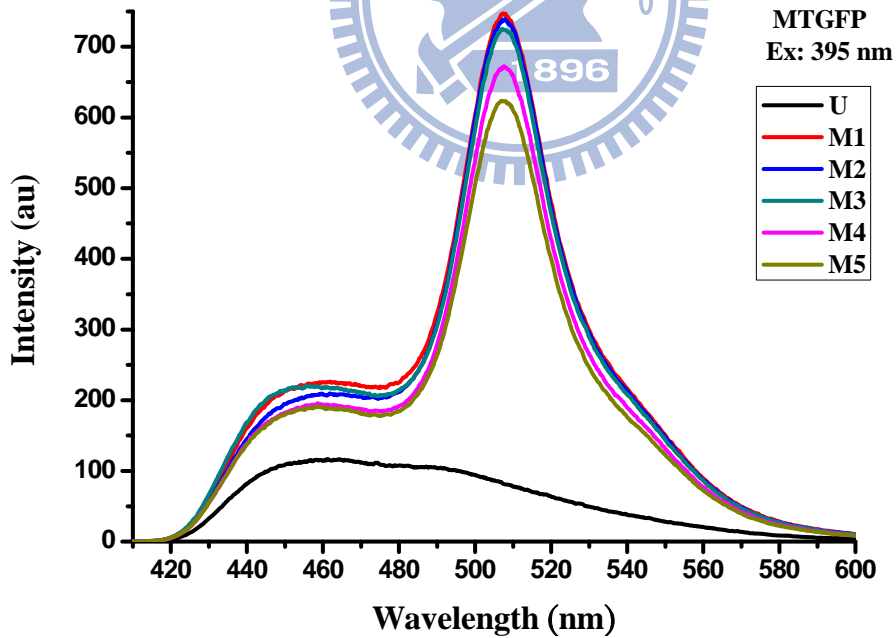


圖 31 MTGFP 摺疊過程中(激發光 395 nm)各中間體的螢光光譜
 螢光激發光波長：395 nm；螢光測定波長：425~580 nm。

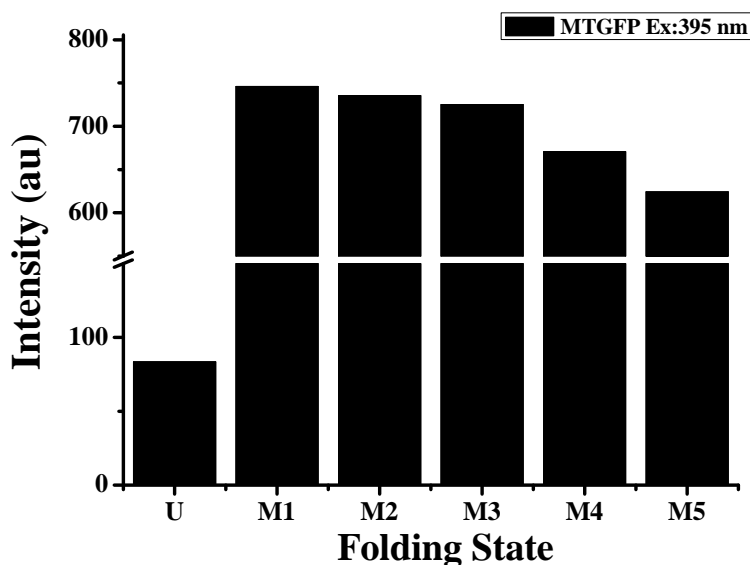


圖 32 MTGFP 摺疊過程中各中間體的螢光強度分佈圖(激發光 395 nm)

利用激發光波長 395 nm 激發 MTGFP 蛋白質中 GFP 蛋白，觀察 U 到 M5 各摺疊狀態其放射光 508nm 的螢光峰值的變化，將其劃成螢光強度的長條圖。從此圖發現 GFP 蛋白質在 U (unfold state) 狀況下，仍然有螢光產生，但螢光強度極低。再利用蛋白質摺疊的方式將蛋白質復性，在 M1 階段 GFP 蛋白質螢光強度則有明顯的增加，但隨著越接近 native state 時，蛋白質螢光強度則逐步下降。

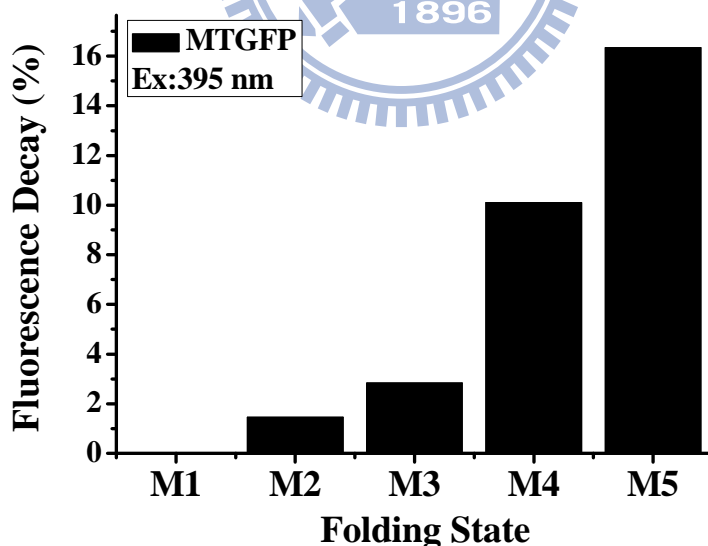


圖 33 MTGFP 摺疊過程中其摺疊中間體的螢光強度衰減圖 (激發光 395 nm)

以 M1 當作最高峰值的螢光強度當作基準，比較各摺疊階段其螢光強度與 M1 螢光強度的差異百分比。結果顯示摺疊過程越接近自然態的同時，螢光衰減則增加。

4-8.3 3D 全光譜尋找 MT 與 GFP 的螢光基團

由於在摺疊過程中，發現 GFP 的螢光逐漸衰弱，所以就推測可能是 MT 蛋白質將 GFP 能量包覆住，或者有螢光能量轉移的現象產生。利用 3D 光譜掃瞄單獨的 MT 蛋白質與 GFP 蛋白質，尋找他們發光基團的立體結構，藉此可得知他們發光基團的範圍大小，確認彼此是否有螢光共振能量轉移的現象產生。由結果得知 MT 蛋白質有專屬於自己的螢光基團(圖 34)，波長 350 nm 是 MT 最大激發光，而波長 440 nm 為主要的放射光。另外 MT 的螢光發光基團與 GFP 螢光發光基團的距離很接近(圖 35)，因此推測他們可能會有能量轉移的現象出現。

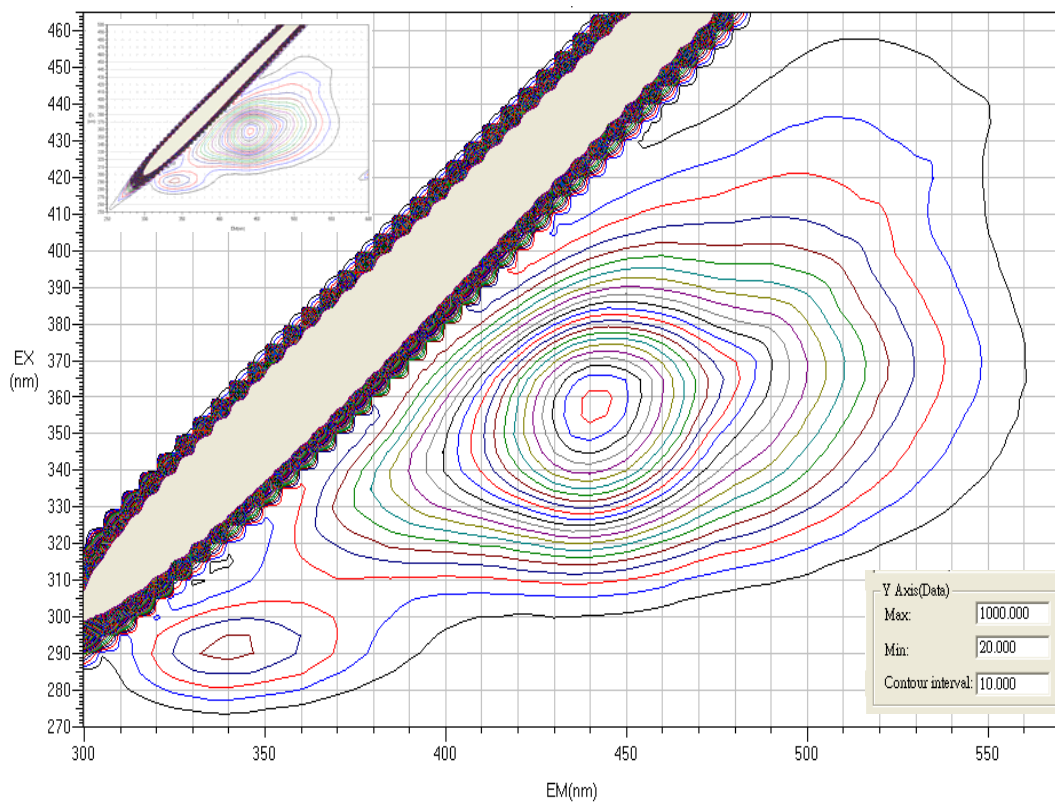


圖 34 Commercial MT 3D 螢光立體光譜

由圖可得知 MT 其激發光範圍為 310 nm 到 450 nm，而其螢光基團放射光範圍為 370 nm 到 550 nm。MT 蛋白質最主要的激發光波長為 350 nm，而其放射光為 440 nm。

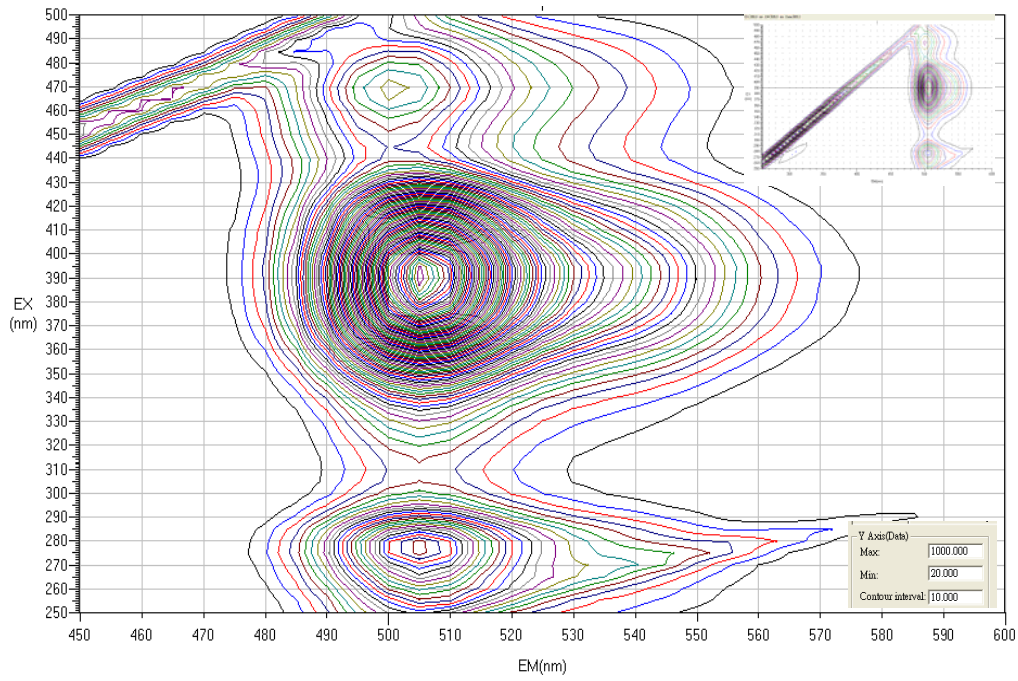
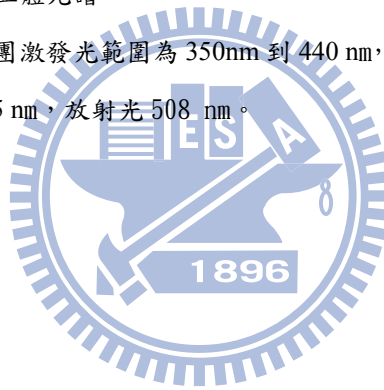


圖 35 GFP 的 3D 螢光立體光譜

發現 GFP 具有螢光基團激發光範圍為 350nm 到 440 nm，放射光範圍為 430 到 550 nm。

其最只要激發光為 395 nm，放射光 508 nm。



4-8.4 MTGFP 蛋白質在摺疊過程中 FRET 的效應

於是利用 350 nm 激發各摺疊中間體，比較 MTGFP 蛋白質內 MT 與 GFP 是否會因為蛋白質摺疊到自然態時，造成兩分子間距離縮小而產生螢光能量轉移的現象。由實驗數據指出，隨著摺疊越接近自然態，利用 350 nm 觀察 MT 發現其螢光能量逐漸下降，而這是表示 MT 的螢光被 quenching。由這裡可推測 MTGFP 此分子在摺疊果過程中可能量轉移的現象產生(圖 36)。

為了釐清 MTGFP 蛋白質能量轉移的現象，首先當用 350 nm 激發 MT 時，同時也會激發到 GFP，所以 MTGFP 蛋白質在 440 nm 產生的螢光，需將 GFP 產生的螢光能量扣除，此時才是真正的 MTGFP 內的 MT 能量。因此利用相同濃度的 MT、GFP、MTGFP 用 350 nm 激發，觀察三者螢光彼此的關係，找出 MTGFP 中的 MT 蛋白質，到底是扮演 quencher 的角色，還是扮演 FRET 的角色(圖 37)。將測量到的 MTGFP 扣除 GFP 的能量後，與 MT 的螢光能量（放射光 440 nm）做比較，而結果顯示 MTGFP 中的 MT 分子有將能量傳遞給 GFP 分子，其螢光強度會低於單獨的 MT 蛋白的螢光(圖 38)，表示有 FRET 效應產生。

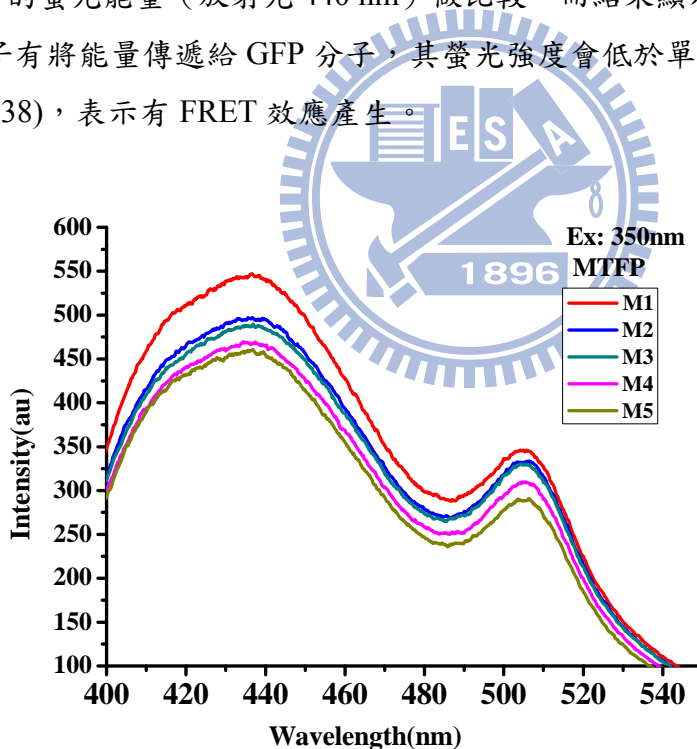
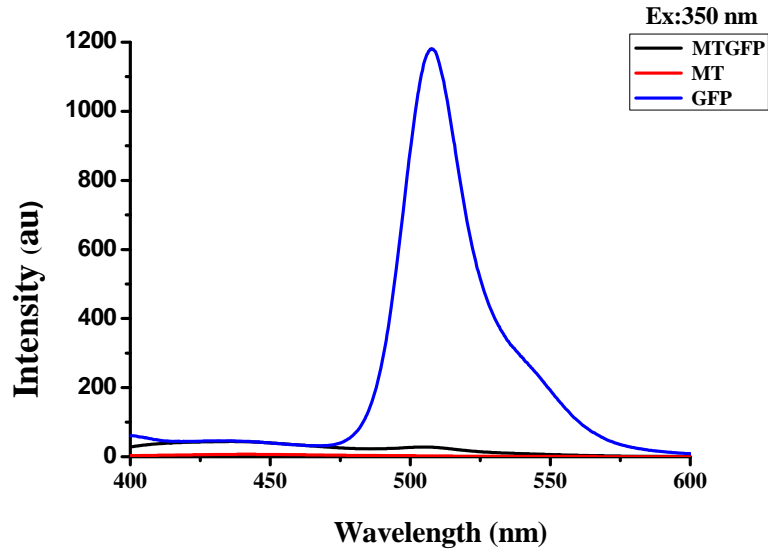


圖 36 MTGFP 摺疊過程中(激發光 350 nm) 各中間體螢光光譜分佈圖

利用激發光 350 nm 觀察 MT 蛋白質在摺疊過程中，看 440 nm 放射光其螢光能量的變化。

(a)



(b)

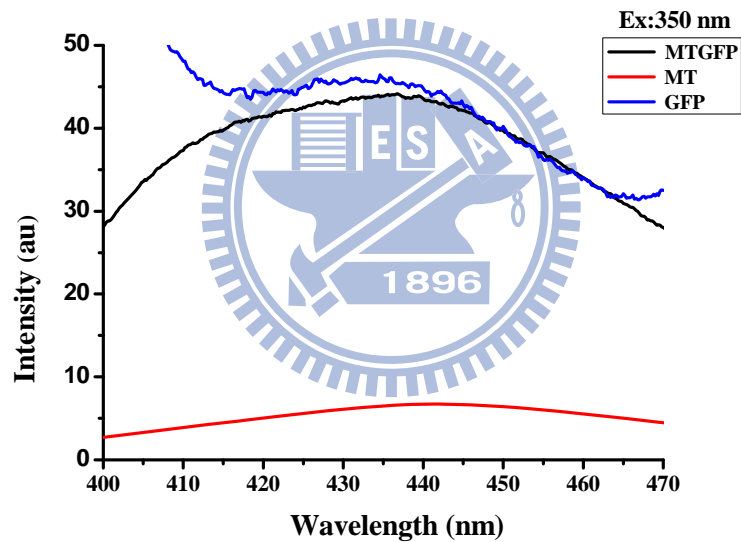


圖 37 用 350 nm 激發觀察 MTGFP、GFP、MT 是否有 FRET 效應

利用激發光 350 nm 激發相同濃度下 MTGFP、GFP、MT，觀察 440 nm 放射光中，MTGFP 內的 MT 是否有 FRET 效應產生。(a)圖為用激發光 350 nm，激發 MTGFP、GFP、MT 等蛋白質時其螢光光譜的變化。(b)圖是將(a)圖的 Y 軸觀察範圍縮小，目的要觀察當用 350 nm 激發 MT 時，在 440 nm 左右會產生 MT 所釋出的螢光。目的是想要知道相同濃度下，用 350 nm 激發 MTGFP、GFP、MT 三種蛋白質分別的螢光強度。

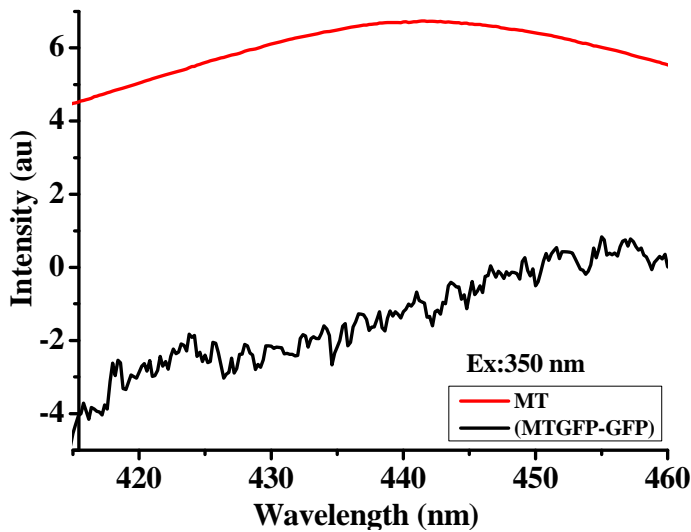


圖 38 MTGFP 螢光扣掉 GFP 螢光後，分析 MT 在 440 nm 左右的螢光變化

在相同濃度下將 MTGFP 螢光扣掉 GFP 螢光後，顯現出來的就是 MTGFP 蛋白質中 MT 的強度，此時與 440 nm 左右純 MT 比較螢光變化，發現 MTGFP 中的 MT 蛋白質其螢光強度比單獨的 MT 弱，代表 MTGFP 中的 MT 有將能量轉給 GFP，產生 FRET 效應產生。

4-8.5 螢光圖譜分析

前述實驗證明 MTGFP 蛋白質有 FRET 效應及 quenching 同時存在，且 FRET 效應是與分子間距離長短有影響，另外 Quenching 的效應，也是因為蛋白質摺疊越來越緊密而產生的。於是利用酵素切割蛋白質，目的是將兩分子(MT、GFP)距離增加，推測可能會使 FRET 效應及 Quenching 效應消失。

於是利用 Enterokinase 與自然態的 MTekGFP 蛋白質執行酵素反應，37 °C、16 小時，反應時間結束後，將蛋白質樣品取出，用 Native Page 做分析，最終用激發光 300 nm 測量跑膠後的結果(圖 39)。之前已經確認 MTekGFP 蛋白質摺疊回自然態時，MT 與 GFP 會造成兩分子間距離縮小，而現在從實驗結果顯示 Enterokinase 切割 MTekGFP 蛋白質分離 MT 與 GFP 時，MTGFP 蛋白質內的 MT 與 GFP 兩分子，因為酵素反應越完全會造成 GFP 螢光增強(圖 39)。用 TINA 軟體去分析跑膠後 GFP 的螢光強度，從結果顯示蛋白質的螢光強度會因著酵素濃度增加而螢光增強。所使用的 Enterokinase 濃度分別為 0U、0.125U、0.25U、0.5U、1U、2U，分別用這些酵素濃度來切割 37.5 ug 的 MTekGFP 的蛋白質(圖 39)。另外從結果發現用 Enterokinase 濃度 2U 去切割蛋白質時，此時 GFP 螢光強度最強。用

Enterokinase 濃度 2U 的 GFP 螢光強度做為 100%，其他相對的螢光強度分別為 37.47%、77.78%、85.21%、87%、98.77%、100%(圖 40)。最終確認酵素濃度越強切割蛋白質效率越佳，則造成 MTGFP 蛋白質內內 MT、GFP 兩分子距離越遠，螢光強度則越增加。

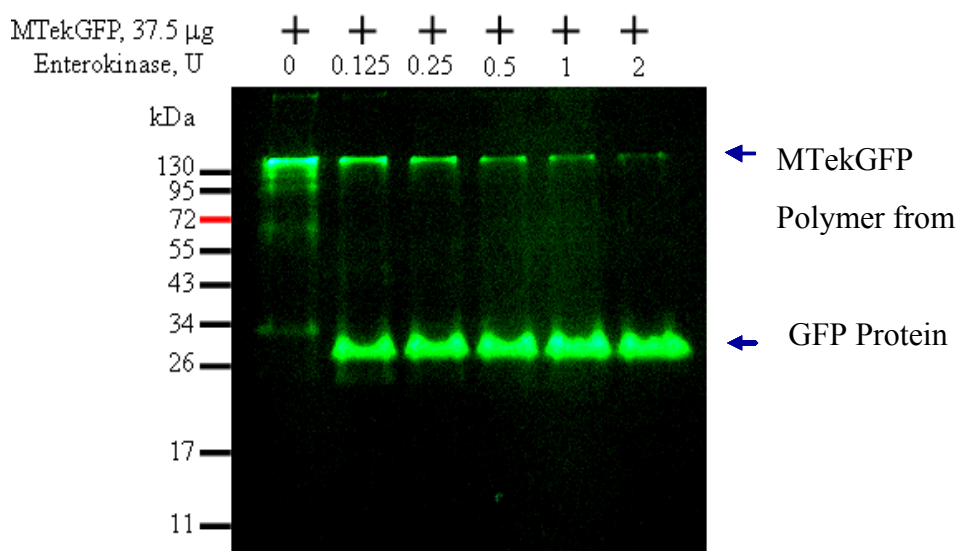


圖 39 Native page 觀察 Enterokinas 切割 MTekGFP 的結果

從膠片發現隨著酵素濃度增加，切割 MTekGFP 蛋白質效果越佳，GFP 螢光強度越亮。

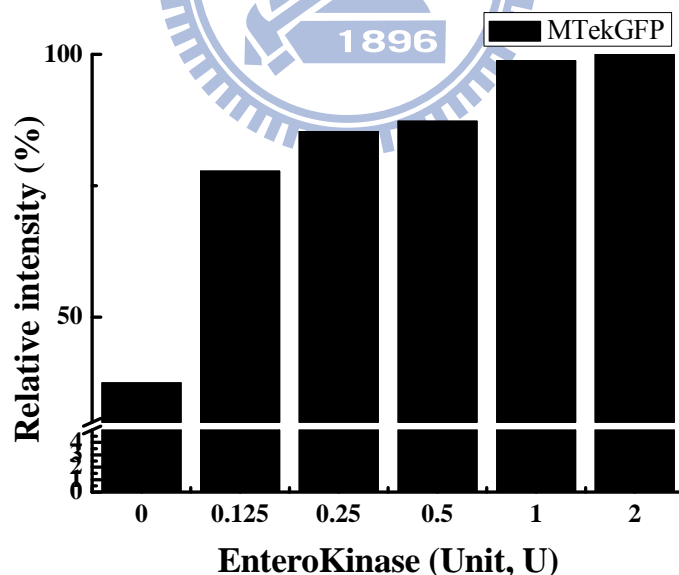


圖 40 用 Enterokinas 切割 MTekGFP 後，用軟體去分析其螢光強度變化

隨著酵素濃度增加，可使蛋白質切割效果增強，而且蛋白質的螢光強度也會增強。

第五章 討論

1. 蛋白質的取得：

首先透過 PCR 與 DNA 定序的方式獲得保存菌種的 DNA 序列，再利用 NCBI 網站做 DNA 序列的 Blast，確認前人保存的菌種是表現 MTGFP 重組蛋白質的菌株。再透過 E.coil 表現 MTGFP 蛋白質，並用 Western 做抗體專一性的確認。隨後再利用 E.coil 大量培養，並利用破菌及清洗蛋白質的方式，獲得大量 MTGFP 蛋白質的內涵體，雖然此時 MTGFP 純度高但不具有生物活性，所以 MTGFP 蛋白質利用階段性熱平衡透析法，將摺疊法蛋白質回復到自然態，進行後續的各項實驗。

2. MTGFP 的蛋白質摺疊：

觀察本實驗所使用的蛋白質摺疊法為階段性熱平衡透析法，也就是利用準靜態的過程來進行蛋白質的透析與摺疊，除了可以避免蛋白質因外界環境劇烈變化而沈澱，也可以避免蛋白質彼此交互作用而聚集，使蛋白質分子能很有效率進行摺疊達到自然態。而自然態的蛋白質其定義不僅只有結構回到自然態，並且也要具有生物活性才算成功的蛋白質復性。所以本實驗收集每個溶液在不同階段下的蛋白質樣品及置換過後的緩衝溶液，測量這些摺疊中間體，摺疊過程中其結構及功能的變化。在結構分析的方面，1. 利用圓二色光譜儀 (CD) 測量蛋白質的二級結構的比例，得知 GFP 在一開始時其結構並沒有完全解開，但與隨著摺疊的過程，使 MT 蛋白質得結構逐漸形成；2. 利用動態光散射儀 (DLS) 測量蛋白質在摺疊過程中，蛋白質分子逐漸摺疊接近自然態，其蛋白質粒徑也逐漸縮小；3. 利用螢光儀分析蛋白質內的芳香族胺基酸的螢光變化，由於蛋白質中的苯環胺基酸會因為吸收波長 280 nm 的紫外光，而造成苯環的電子共振產生螢光。然而利用波長 280 nm 的激發光偵測蛋白質的摺疊狀態時，發現蛋白質釋放出的螢光強度隨著摺疊越接近自然態而越增加，且其螢光波峰也逐漸往短波長移動，就是俗稱的藍位移，也就表示蛋白質因為摺疊步驟接近自然態時，其蛋白質的摺疊結構比較緊密，此時疏水性胺基酸通常已經被包埋在蛋白質內部形成疏水性的核心形成穩定結構，所以能量不易被釋放，因此可使得螢光強度較強也較高。反之，蛋白質在摺疊初期疏水性胺基酸暴露在親水性的環境中，所以蛋白質結構很不穩定，會和環境周圍的粒子作用產生能階不穩定，使得能量以熱能的形式流失，因此螢光的能量也較低，朝向長波長移動就是俗稱的紅位移。綜合以上三種方式可以確認 MTGFP 蛋白質在結構上已經摺疊回自然態。

在功能方面，因為 MTGFP 是個融合蛋白，所以仍然保留原本蛋白質分子的特性，利用 ICP-AES 偵測 MTGFP 蛋白質上有七個金屬螯合位置對金屬的螯合能力，

然而測量後發現幾乎每個 MTGFP 分子，可接 6~7 個金屬；再利用螢光蛋白激發 p-hydroxybenzyliden-imidazolidinone 的結構後，可產生能量共振釋出螢光。

在本論文中發現兩個特別的現象，第一：MTGFP 在蛋白質摺疊過程中，利用 395 nm 觀察 MTGFP 分子內的 GFP 時，其 GFP 螢光的強度隨著蛋白質摺疊過程而逐漸降低(圖 31)，可能是在蛋白質摺疊過程中 GFP 會把能量轉給 MT，產生 Quenching 效應；第二：用 3 D 螢光光譜分析純 MT 及純 GFP，發現這兩個蛋白質其螢光基團彼此很相近(圖 34、圖 35)，所以在本實驗室自行合成的 MTGFP 蛋白質分子內，MT 除了有可能是 Quencher 抵制 MTGFP 中的 GFP 螢光外，也有可能 MT 可以產生 FRET 的現象將能量轉給 GFP。

為了要證明 MTGFP 中的 MT 有螢光轉移的效應的產生，將能量轉給 GFP，於是利用激發光 350 nm 觀察 MTGFP 中的 MT 蛋白質，在扣除掉 GFP 影響因素下，其螢光強度低於相同濃度的 MT 蛋白質(圖 38)。再者利用酵素(Enterokinase)切割此分子內的 MT 及 GFP，進行跑 Native page 確認螢光蛋白的分佈，並利用波長 300 nm 的紫外光照膠臺去偵測蛋白質螢光，發現 MTGFP 蛋白質的螢光隨著酵素增加，使得 MT 及 GFP 的距離增加，然而蛋白質螢光隨之上升，所以推測 MT 蛋白質的結構會吸收 GFP 的螢光(圖 39、圖 40)。然而 MTGFP 蛋白質在摺疊過程中其 GFP 的能量有逐漸降低，但根據能量不減原理，這些喪失的能量應該是以熱能的形式釋出。

總結:我們發現 MT 蛋白質本身具有金屬環，可以產生 FRET 效應，將螢光能量轉給 GFP，同時也是可以將 GFP 的螢光能量消耗的殺手，因為隨著蛋白質摺疊結構越來越接近 native state 時，MT 蛋白質會變成 quencher 走 static quenching 路徑 quench GFP 蛋白質螢光的表現。另外對於未來發展，MT 本身是 random coil 的形式，沒有特定結構，所以未來可以利用 MTGFP 蛋白質，做為 MT 蛋白質的摺疊即時的偵測器。

第六章 參考文獻

1. Rose GD, Fleming PJ, Banavar JR, Maritan A: A backbone-based theory of protein folding. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006, 103, 16623-16633.
2. Edelman J, Denton M: The uniqueness of biological self-organization: challenging the Darwinian paradigm. *Biology and Philosophy* 2007, 22, 579-601.
3. Bühler RHO, Kägi JHR: Human hepatic metallothioneins. *FEBS Letters* 1974, 39, 229-234.
4. Nu'ria RI, Milan V: Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2002, 88, 388-396.
5. Viarengo A, Ponzano E, Dondero F, Fabbri R: A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Marine Environmental Research* 1997, 44, 69-84.
6. Nielson KB, Winge DR: Independence of the domains of metallothionein in metal binding. *Journal of Biological Chemistry* 1985, 260, 8698-8701.
7. Margoshes M, Vallee BL: A cadmium protein from equine kidney cortex. *Journal of the American Chemical Society* 1957, 79, 4813-4814.
8. Chang CC, Lee SF, Sun KW, Ho CC, Chen YT, Chang CH, Kan LS: Mn,Cd-metallothionein-2: A room temperature magnetic protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006, 340, 1134-1138.
9. Martin C: Green fluorescent protein *Photochemistry and Photobiology* 1995, 62, 651-656.
10. Meighen EA: Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1991, 55, 123-142.
11. Waldo GS, Standish BM, Berendzen J, Terwilliger TC: Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nature Biotechnology* 1999, 17, 691-695.

12. Vasiljevic S, Ren J, Yao Y, Dalton K, Adamson C, Jones I: Green fluorescent protein as a reporter of prion protein folding. *Virology Journal* 2006, 3, 59.
13. Philipps B, Hennecke J, Glockshube R: FRET-based in Vivo Screening for Protein Folding and Increased Protein Stability. *Journal of Molecular Biology* 2003, 327, 239-249.
14. GadellaJr TWJ, van der K, M. GN, Bisseling T: GFP-based FRET microscopy in living plant cells. *Trends in Plant Science* 1999, 4, 287-291.
15. Verveer PJ, Bastiaens PIH, Edward AD: FRET Analysis of Signaling Events in Cells. In *Handbook of Cell Signaling*. Edited by: Academic Press; 2003:305-309.
16. Pearce LL, Gandley RE, Han WP, Wasserloos K, Stitt M, Kanai AJ, McLaughlin MK, Pitt BR, Levitan ES: Role of metallothionein in nitric oxide signaling as revealed by a green fluorescent fusion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000, 97, 477-482.
17. Piston DW, Kremers G-J: Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *Trends in Biochemical Sciences* 2007, 32, 407-414.
18. Schmid JA, Birbach A: Fluorescent proteins and fluorescence resonance energy transfer (FRET) as tools in signaling research. *Thrombosis and Haemostasis* 2007, 97, 378-384.
19. Thomas H: Förster Resonance Energy Transfer. 2004.
20. Mitra RD, Silva CM, Youvan DC: Fluorescence resonance energy transfer between blue-emitting and red-shifted excitation derivatives of the green fluorescent protein. *Gene* 1996, 173, 13-17.
21. Ma'tyus Ls, Szo'llo'si Jn, Jenei A: Steady-state fluorescence quenching applications for studying protein structure and dynamics. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2006, 83, 223-236.
22. Eftink MR, Ghiron CA: Fluorescence quenching studies with proteins. *Analytical Biochemistry* 1981, 114, 199-227.

23. 柯以侃: 儀器分析, vol 155-173; 1996.
24. Eftink M: Fluorescence Quenching: Theory and Applications. In *Topics in Fluorescence Spectroscopy*. Edited by; 2002:53-126.
25. Ando T, Fujisaki H, Asai H: Electric Potential at Regions near the Two Specific Thiols of Heavy Meromyosin Determined by the Fluorescence Quenching Technique: I. Effect of ATP. *Journal of Biochemistry* 1980, 88, 265-276.
26. Ando T, Asai H: Charge Effects on the Dynamic Quenching of Fluorescence of 1, N6-Ethenoadenosine Oligophosphates by Iodide, Thallium (I) and Acrylamide. *Journal of Biochemistry* 1980, 88, 255-264.
27. Kronman MJ, Holmes LG: The Fluorescence of native,denatured and reduced-denatured proteins *Photochemistry and Photobiology* 1971, 14, 113-134.
28. Eftink MR, Ghiron CA: Fluorescence quenching of indole and model micelle systems. *The Journal of Physical Chemistry* 1976, 80, 486-493.
29. Eftink MR, Jameson DM: Acrylamide and oxygen fluorescence quenching studies with liver alcohol dehydrogenase using steady-state and phase fluorometry. *Biochemistry* 1982, 21, 4443-4449.
30. Lehrer S: Corrections - Solute Perturbation of Protein Fluorescence. The Quenching of the Tryptophyl Fluorescence of Model Compounds and Lysozyme by Iodide Ion. *Biochemistry* 1971, 10, 4995-4995.
31. Zhao S, Niu T, Song Y, Liu Y-M: Gold nanoparticle-enhanced chemiluminescence detection for CE. *Electrophoresis* 2009, 30, 1059-1065.
32. 鄧昌蔚: 化學發光. *科學教育月刊* 民 91, 246 期.
33. 陸崇軒: 利用攪拌式流體化床吸附技術從非澄清菌液中直接回收增強型綠色螢光蛋白. Edited by 劉昭麟 張: 明志科技大學 民 96
34. Shimomura O: Bioluminescence: chemical principles and methods. In *World Scientific*. Edited by; 2006.

35. Shimomura O: The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *Journal of Microscopy* 2005, 217, 3-15.
36. Coleman R: Jellyfish, fluorescent proteins, Nobel Prizes and pioneers in histochemistry. *Acta Histochemica* 2008, In Press, Corrected Proof.
37. Inouye S, Tsuji FI: Evidence for redox forms of the Aequorea green fluorescent protein *FEBS Lett* 1994, 351.
38. Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y: Microdetermination of Calcium by Aequorin Luminescence. *Science* 1963, 140, 1339-1340.
39. Takahashi A, Camacho P, Lechleiter JD, Herman B: Measurement of Intracellular Calcium. *Physiological Reviews* 1999, 79, 1089-1125.
40. Inouye S, Ogawa H, Yasuda K, Umesono K, Tsujia FI: A bacterial cloning vector using a mutated Aequorea green fluorescent protein as an indicator *Gene* 1997, 189, 159-162.
41. Matz MV, Fradkov AF, Labas YA, Savitsky AP, Zaraisky AG, Markelov ML, Lukyanov SA: Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat Biotech* 1999, 17, 969-973.
42. Gurskaya NG, Fradkov AF, Terskikh A, Matz MV, Labas YA, Martynov VI, Yanushevich YG, Lukyanov KA, Lukyanov SA: GFP-like chromoproteins as a source of far-red fluorescent proteins. *FEBS Letters* 2001, 507, 16-20.
43. Schultz C: Fluorescent Revelations. *Chemistry & Biology* 2009, 16, 107-111.
44. Xu Y, Kanauchi A, von Arnim AG, Piston DW, Johnson CH, Gerard M, Ian P: Bioluminescence resonance energy transfer: Monitoring protein-protein interactions in living cells. In *Methods in Enzymology*. Edited by: Academic Press; 2003:289-301. vol 360.
45. Inoue S, Goda M: Fluorescence Polarization of GFP Crystals. *The Biological Bulletin* 2001, 201, 231-a-232.

46. Morise H SO, Johnson FH, Winant J.: Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry* 1974 13.
47. Prasher D, Eckenrode V, Ward W, Prendergast F, Cormier M: Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*. 1992, 111, 229-233.
48. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC: Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. *Science* 1994, 263, 802-805.
49. Tsien RY: The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry* 1998, 67, 509-544.
50. Ishimura Y, Nozaki M, Yamamoto S, Shimizu T, Narumiya S, Mitani F (Ed): *Oxygen and life: oxygenases, oxidase, and lipid mediators* Elsevier Science Health Science 2002.
51. Orm M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY, Remington SJ: Crystal Structure of the *Aequorea victoria* Green Fluorescent Protein. *Science* 1996, 273, 1392-1395.
52. Yang F, Moss LG, Phillips GN: The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotech* 1996, 14, 1246-1251.
53. Heim R, Tsien RY: Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Current Biology* 1996, 6, 178-182.
54. Cubitt AB, Heim R, Adams SR, Boyd AE, Gross LA, Tsien RY: Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 1995, 20, 448-455.
55. Zimmer M: Green Fluorescent Protein (GFP):Applications, Structure, and Related Photophysical Behavior. *Chemical Reviews* 2002, 102, 759-782.
56. Attila Nagy AM-C, Béla Somogyi and Dénes L rinczy: Thermal stability of chemically denatured green fluorescent protein (GFP):A preliminary study *Thermochimica Acta* 2004 410, 161-163.

57. Pakhomov AA, Martynov VI: GFP family: Structural insights into spectral tuning. *Chemistry & Biology* 2008, 15, 755-764.
58. Heim R, Cubitt AB, Tsien RY: Improved green fluorescence. *Nature* 1995, 373, 663-664.
59. Miesenbock G, De Angelis DA, Rothman JE: Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* 1998, 394, 192-195.
60. William WW, Hugh JP, Amy FR, Chris WC, Sue CR: Spectral perturbations of the aequorea green-fluorescent protein. *Photochemistry and Photobiology* 1982, 35, 803-808.
61. Ward WW, Bokman SH: Reversible denaturation of Aequorea green-fluorescent protein: physical separation and characterization of the renatured protein. *Biochemistry* 1982, 21, 4535-4540.
62. Shimomura O, Frank H, Yo Saiga J: Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 1962, 59, 223-239.
63. Matz MV, Lukyanov KA, Lukyanov SA: Family of the green fluorescent protein: Journey to the end of the rainbow. *BioEssays* 2002, 24, 953-959.
64. Shaner NC, Steinbach PA, Tsien RY: A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Meth* 2005, 2, 905-909.
65. Kagi JHR, Schaffer A: Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry* 1988, 27, 8509-8515.
66. Palmiter RD: The elusive function of metallothioneins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, 95, 8428-8430.
67. Ceratto N, Dondero F, van de Loo J-W, Burlando B, Viarengo A: Cloning and sequencing of a novel metallothionein gene in *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 2002, 131, 217-222.
68. Beattie JH, Wood AM, Trayhurn P, Jasani B, Vincent A, McCormack G, West AK: Metallothionein is expressed in adipocytes of brown fat and is induced by catecholamines

- and zinc. *AJP - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2000, 278, R1082-1089.
69. Kameo S, Iwahashi H, Kojima Y, Satoh H: Induction of metallothioneins in the heavy metal resistant fungus *Beauveria bassiana* exposed to copper or cadmium. *Analisis* 2000, 28, 382-385.
70. Chang C-C, Huang PC: Semi-empirical simulation of Zn/Cd binding site preference in the metal binding domains of mammalian metallothionein. *Protein Engineering Design and Selection* 1996, 9, 1165-1172.
71. Duncan KER, Ngu TT, Chan J, Salgado MT, Merrifield ME, Stillman MJ: Peptide Folding, Metal-Binding Mechanisms, and Binding Site Structures in Metallothioneins. *Experimental Biology and Medicine* 2006, 231, 1488-1499.
72. Furey WF, Robbins AH, Clancy LL, Winge DR, Wang BC, Stout CD: Crystal structure of Cd,Zn metallothionein. *Science* 1986, 231, 704-710.
73. Braun W, Vasak M, Robbins AH, Stout CD, Wagner G, Kagi JHR, Wuthrich K: Comparison of the NMR solution structure and the x-ray crystal-structure of rat metallothionein-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992, 89, 10124-10128.
74. Vašák M: Advances in metallothionein structure and functions. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2005, 19, 13-17.
75. Binz PA, Kagi JHR: Metallothionein: Molecular evolution and classification. In *4TH International Metallothionein Meeting (MT-97)*. Edited by Klaassen CD. Kansas City, Mo: Birkhauser Verlag Ag; 1999:7-13.
76. Cherian MG, Jayasurya A, Bay B-H: Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2003, 533, 201-209.
77. Mizzen CA, Cartel NJ, Yu WH, Fraser PE, McLachlan DR: Sensitive detection of metallothioneins-1, -2 and -3 in tissue homogenates by immunoblotting: a method for

- enhanced membrane transfer and retention. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 1996, 32, 77-83.
78. Dean L, Pountney, Milan V: Spectroscopic studies on metal distribution in Co(II)/Zn(II) mixed-metal clusters in rabbit liver metallothionein 2. *European Journal of Biochemistry* 1992, 209, 335-341.
79. Butt TR, Ecker DJ: Yeast metallothionein and applications in biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1987, 51, 351-364.
80. Shuja RN, Shakoori AR: Identification and cloning of first cadmium metallothionein like gene from locally isolated ciliate, *Paramecium* sp. *Molecular Biology Reports* 2009, 36, 549-560.
81. Grill E, Winnacker E-L, Zenk MH: Phytochelatin, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987, 84, 439-443.
82. Hidalgo J, Penkowa M, Espejo C, Martinez-Caceres EM, Carrasco J, Quintana A, Molinero A, Florit S, Giralt M, Ortega-Aznar A: Expression of Metallothionein-I, -II, and -III in Alzheimer Disease and Animal Models of Neuroinflammation. *Experimental Biology and Medicine* 2006, 231, 1450-1458.
83. Chapman GA, Kay J, Kille P: Structural and functional analysis of the rat metallothionein III genomic locus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1999, 1445, 321-329.
84. Orihuela R, Domenech J, Bofill R, You C, Mackay EA, Kagi JHR, Capdevila M, Atrian S: The metal-binding features of the recombinant mussel *Mytilus edulis* MT-10-IV metallothionein. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 2008, 13, 801-812.
85. Boulanger Y, Goodman CM, Forte CP, Fesik SW, Armitage IM: Model for mammalian metallothionein structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1983, 80, 1501-1505.
86. P.-A. Binz JHRK: Classification of Metallothionein. 2003.

87. Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM: Metallothionein: The multipurpose protein. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2002, 59, 627-647.
88. Davis SR, Cousins RJ: Metallothionein Expression in Animals: A Physiological Perspective on Function. *Journal of Nutrition* 2000, 130, 1085-1088.
89. Kramer KK, Liu J, Choudhuri S, Klaassen CD: Induction of Metallothionein mRNA and Protein in Murine Astrocyte Cultures. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1996, 136, 94-100.
90. Palumaa P, Tammiste I, Kruusel K, Kangur L, Jörnvall H, Sillard R: Metal binding of metallothionein-3 versus metallothionein-2: lower affinity and higher plasticity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* 2005, 1747, 205-211.
91. Auslander M, Yudkovski Y, Chalifa-Caspi V, Herut B, Ophir R, Reinhardt R, Neumann P, Tom M: Pollution-Affected Fish Hepatic Transcriptome and Its Expression Patterns on Exposure to Cadmium. *Marine Biotechnology* 2008, 10, 250-261.
92. Domitrović R, Jakovac H, Grebić D, Milin Č, Radošević-Stašić B: Dose- and Time-Dependent Effects of Luteolin on Liver Metallothioneins and Metals in Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity in Mice. *Biological Trace Element Research* 2008, 126, 176-185.
93. Kagi JHR: Overview of metallothionein. *Methods in Enzymology* 1991, 205, 613-626.
94. Uchida Y, Takio K, Titani K, Ihara Y, Tomonaga M: The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron* 1991, 7, 337-347.
95. Kagi JHR: Evolution, structure and chemical activity of class-I metallothioneins - an overview. In *3rd International Conference on Metallothionein Dec; Tsukuba, Japan*, Edited by Suzuki KT, Imura N, Kimura M: Birkhauser Verlag: 1992:29-55.
96. Koropatnick J, Dale S, Zalups R: Metallothionein and Innate Activation of Primary Human and Mouse Monocytes. In *Trace Elements in Man and Animals 10*. Edited by; 2000:47-50.

97. Miles AT, Hawksworth GM, Beattie JH, Rodilla V: Induction, Regulation, Degradation, and Biological Significance of Mammalian Metallothioneins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 2000, 35, 35-70.
98. Haq F, Mahoney M, Koropatnick J: Signaling events for metallothionein induction. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2003, 533, 211-226.
99. Rising L, Vitarella D, Kimelberg HK, Aschner M: Cadmium chloride (CdCl₂)-induced metallothionein (MT) expression in neonatal rat primary astrocyte cultures. *Brain Research* 1995, 678, 91-98.
100. Erickson JC, Masters BA, Kelly EJ, Brinster RL, Palmiter RD: Expression of human metallothionein-III in transgenic mice. *Neurochemistry International* 1995, 27, 35-41.
101. Masters BA, Kelly EJ, Quaife CJ, Brinster RL, Palmiter RD: Targeted disruption of metallothionein I and II genes increases sensitivity to cadmium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994, 91, 584-588.
102. Masters BA, Quaife CJ, Erickson JC, Kelly EJ, Froelick GJ, Zambrowicz BP, Brinster RL, Palmiter RD: Metallothionein III is expressed in neurons that sequester zinc in synaptic vesicles. *Journal of Neuroscience* 1994, 14, 5844-5857.
103. Quaife CJ, Findley SD, Erickson JC, Froelick GJ, Kelly EJ, Zambrowicz BP, Palmiter RD: Induction of a New Metallothionein Isoform (MT-IV) Occurs during Differentiation of Stratified Squamous Epithelia. *Biochemistry* 1994, 33, 7250-7259.
104. Oda N, Sogawa CA, Sogawa N, Onodera K, Furuta H, Yamamoto T: Metallothionein expression and localization in rat bone tissue after cadmium injection. *Toxicology Letters* 2001, 123, 143-150.
105. Ebara M, Fukuda H, Kojima Y, Morimoto N, Yoshikawa M, Sugiura N, Satoh T, Kondo F, Yukawa M, Matsumoto T, et al.: Small Hepatocellular Carcinoma: Relationship of Signal Intensity to Histopathologic Findings and Metal Content of the Tumor and Surrounding Hepatic Parenchyma. *Radiology* 1999, 210, 81-88.

106. Chang C, Yeh X, Lee H, Lin P, Kan L: Reversible Folding of Lysozyme by a Quasi-static Process: A First-Order-Like State Transition. *Bulletin of the American Physical Society*. 2004, 49, 11904.
107. Lowe G: The structure and mechanism of action of papain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1970, 257, 237-248.
108. Neurath H, Greenstein J, Putnam F, Erickson J: The chemistry of protein denaturation. *Chem. Rev* 1943, 32, 157-265.
109. Mckee T: Peptide and Protein in *Biochemistry* 1996, 78-116.
110. Campbell MK: The three-dimensional structure of proteins. In *in Biochemistry*. Edited by: Saunders College Publishing, Philadelphia.; 1995:86-188.
111. Liu Y-L, Lee H-T, Chang CC, Kan LS: Reversible folding of cysteine-rich metallothionein by an overcritical reaction path. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003, 306, 59-63.
112. De Bernardez Clark E: Refolding of recombinant proteins. *Current Opinion in Biotechnology* 1998, 9, 157-163.
113. Yasuda M, Murakami Y, Sowa A, Ogino H, Ishikawa H: Effect of Additives on Refolding of a Denatured Protein. *Biotechnology Progress* 1998, 14, 601-606.
114. Goldberg ME, Rudolph R, Jaenicke R: A kinetic study of the competition between renaturation and aggregation during the refolding of denatured-reduced egg white lysozyme. *Biochemistry* 1991, 30, 2790-2797.
115. Chang C, Cheng M, Su Y, Kan L: A first-order like state transition for recombinant protein folding. *Journal of biomolecular structure & dynamics* 2003, 21, 247-255.
116. Privalov PL: Intermediate States in Protein Folding. *Journal of Molecular Biology* 1996, 258, 707-725.
117. Ptitsyn O, Pain R, Semisotnov G, Zerovnik E, Razgulyaev O: Evidence for a molten globule state as a general intermediate in protein folding. *FEBS Lett* 1990, 262, 20-24.

118. Kim PS, Baldwin RL: Specific Intermediates in the Folding Reactions of Small Proteins and the Mechanism of Protein Folding. *Annual Review of Biochemistry* 1982, 51, 459.
119. Lau AWC, Lin K-H, Yodh AG: Entropic interactions in suspensions of semiflexible rods: Short-range effects of flexibility. *Physical Review E* 2002, 66, 020401.
120. Ackerson BJ, Pusey PN: Shear-Induced Order in Suspensions of Hard Spheres. *Physical Review Letters* 1988, 61, 1033.
121. Chen Y, Barkley MD: Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins. *Biochemistry* 1998, 37, 9976-9982.
122. Clank EB: Protein refolding for industrial processes. *Curr. Opin. Biotechnol* 2001, 12, 202-207.
123. Middelberg APJ: Preparative protein refolding. *Trends in Biotechnology* 2002, 20, 437-443.
124. Clark EB: Refolding of recombinant proteins. *Curr. Opin. Biotechnol* 1998, 9, 157-163.
125. Batas B, Chaudhuri JB: Protein refolding at high concentration using size-exclusion chromatography. *Biotechnology and Bioengineering* 1996, 50, 16-23.
126. Maeda Y, Koga H, Yamada H, Ueda T, Imoto T: Effective renaturation of reduced lysozyme by gentle removal of urea. *Protein engineering* 1995, 8, 201-205.
127. Yoshii H, Furuta T, Yonehara T, Ito D, Linko Y-Y, Linko P: Refolding of Denatured/Reduced Lysozyme at High Concentration with Diafiltration. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2000, 64, 1159-1165.
128. Cai B, Zheng Q, Huang ZX: The properties of the metal-thiolate clusters in recombinant mouse metallothionein-4. *Protein Journal* 2005, 24, 327-336.
129. Rudolph R, Lilie H: In vitro folding of inclusion body proteins. *The FASEB Journal* 1996, 10, 49-56.

130. Shampo MA, Kyle RA: Kary B. Mullis—Nobel Laureate for Procedure to Replicate DNA. *Mayo Clinic Proceedings* 2002, 77, 606-606.
131. Miao F, Kompala DS: Overexpression of cloned genes using recombinant *Escherichia coli* regulated by a T7 promoter: I. Batch cultures and kinetic modeling. *Biotechnology and Bioengineering* 1992, 40, 787-796.
132. Sriubolmas N, Panbangred W, Sriurairatana S, Meevootisom V: Localization and characterization of inclusion bodies in recombinant *Escherichia coli* cells overproducing penicillin G acylase. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1997, 47, 373-378.
133. Carrió MM, Rafael C, Antonio V: Fine architecture of bacterial inclusion bodies. *FEBS Letters* 2000, 471, 7-11.
134. Carrió MM, Antonio V: Role of molecular chaperones in inclusion body formation. *FEBS Letters* 2003, 537, 215-221.
135. M. Mar Carrió, Antonio V: Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is reversible. *FEBS Letters* 2001, 489, 29-33.
136. Haase-Pettingell CA, King J: Formation of aggregates from a thermolabile in vivo folding intermediate in P22 tailspike maturation. A model for inclusion body formation. *Journal of Biological Chemistry* 1988, 263, 4977-4983.
137. Mitraki A, King J: Protein Folding Intermediates and Inclusion Body Formation. *Nat Biotech* 1989, 7, 690-697.
138. Singh SM, Panda AK: Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2005, 99, 303-310
139. Datar RV, Cartwright T, Rosen CG: Process economics of animal cell and bacuterial fermentations: a case study analysis of tissuse plasminogen activator *Bio/Technology* 1993, 11, 349-357.

140. Fischer B, Sumner I, Goodenough P: Isolation and renaturation of bio-active proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Arzneimittel-Forschung* 1992, 42, 1512-1515.
141. Marston FA: The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochemical Journal* 1986, 240, 1-12.
142. Misawa S, Kumagai I: Refolding of therapeutic proteins produced in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Biopolymers (peptide science)* 1999.
143. Batas B, Schiraldi C, Chaudhuri JB: Inclusion body purification and protein refolding using microfiltration and size exclusion chromatography. *Journal of Biotechnology* 1999, 68, 149-158.
144. Jhansi M-R, Brian DK, Eliana De Bernardez C: Effect of Inclusion Body Contaminants on the Oxidative Renaturation of Hen Egg White Lysozyme. *Biotechnology Progress* 1997, 13, 144-150.
145. Haneskog L: Preparation of Denatured Protein Samples from Inclusion Bodies. *Cold Spring Harbor Protocols* 2006, 2006, pdb.prot4265.
146. Matsubara M, Sakai T, Nohara D: Difference between guanidinium chloride and urea as denaturants of globular proteins : the possibility of application to improved refolding processes. *Chemical and pharmaceutical bulletin* 1992, 40, 550-552.
147. Nohara D, Matsubara M, Tano K, Sakai T: Design of optimum refolding solution by combination of reagents classified by specific function. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 1996, 82, 401-403.
148. Ajit S: Review: Protein refolding and inactivation during bioseparation: Bioprocessing implications. *Biotechnology and Bioengineering* 1995, 48, 481-489.
149. Johannes Stöckel KD, Joachim Malotka , Fritz Jähnig , Klaus Dornmair Pathway of Detergent-Mediated and Peptide Ligand-Mediated Refolding of Heterodimeric Class II Major Histocompatibility Complex (MHC) Molecules. *European Journal of Biochemistry* 1997, 248, 684-691.

150. Cardamone M, Puri NK, Brandon MR: Comparing the Refolding and Reoxidation of Recombinant Porcine Growth Hormone from a Urea Denatured State and from Escherichia coli Inclusion Bodies. *Biochemistry* 1995, 34, 5773-5794.
151. Burgess R: Purification of overproduced Escherichia coli RNA polymerase sigma factors by solubilizing inclusion bodies and refolding from Sarkosyl. *Methods in Enzymology* 1996, 273, 145-149.
152. Kurucz I, Titus JA, Jost CR, Segal DM: Correct disulfide pairing and efficient refolding of detergent-solubilized single-chain Fv Proteins from bacterial inclusion bodies. *Molecular Immunology* 1995, 32, 1443-1452.
153. J. Netzera W, Hartlb FU: Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and -independent mechanisms. *Trends in Biochemical Sciences* 1998, 23, 68-73.
154. Wiedmann B, Sakai H, Davis TA, Wiedmann M: A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature* 1994, 370, 434-440.
155. Horwich AL, Low KB, Fenton WA, Hirshfield IN, Furtak K: Folding in vivo of bacterial cytoplasmic proteins: Role of GroEL. *Cell* 1993, 74, 909-917.
156. Chaikin P, Lubensky T: Principles of condensed matter physics. *Cambridge University Press* 2002.
157. Chang C-C, Su Y-C, Cheng M-S, Kan L-S: Protein folding by a quasi-static-like process: A first-order state transition. *Physical Review E* 2002, 66, 021903.
158. Chang C-C, Tsai C-T, Chang C-Y: Structural restoration of inactive recombinant fish growth hormones by chemical chaperonin and solvent restraint approaches. *Protein Engineering Design and Selection* 2002, 15, 437-441.
159. 張家靖: 蛋白質摺疊與聚集. *物理雙月刊* 2006, 28, 668-675.
160. Fersht AR: Nucleation mechanisms in protein folding. *Current Opinion in Structural Biology* 1997, 7, 3-9.

161. W. Curtis Johnson J: Protein secondary structure and circular dichroism: A practical guide. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 1990, 7, 205-214.
162. Chang C, Wu C, Yang J: Circular dichroic analysis of protein conformation: inclusion of the beta-turns. *Anal Biochem* 1978, 91, 13~31.
163. Berova N, Nakanishi K, Woody RW: *Circular dichroism: Principles and applications*: Wiley-Blackwell; 2000.
164. Lakowicz JR: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Plenum Press new year 1981.
165. McLachlan AD: Resonance transfer of molecular excitation energy. *Molecular Physics* 1964, 8, 409-423.
166. Deweyand GT, Hammes GG: Calculation on fluorescence resonance energy transfer on surfaces. *The Biophysical Society* 1980, 32.
167. 黃堂正: 白光高分子電激發光元件結合彩色濾光片之全彩化研究, 民 97.
168. Quay SC, Heropoulos A, Commes K, Dzau VJ: Probing the renin active site by collisional quenching of endogenous fluorescence. *Journal of Biological Chemistry* 1985, 260, 15055-15058.
169. Möller M, Denicola A: Protein tryptophan accessibility studied by fluorescence quenching. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 2002, 30, 175-178.
170. Lehrer SS, Leavis PC, Hirs CHW, Serge NT: Solute quenching of protein fluorescence. In *Methods in Enzymology*. Edited by: Academic Press; 1978:222-236. vol 49.]
171. Rahman M, Harmon HJ: Absorbance change and static quenching of fluorescence of meso-tetra(4-sulfonatophenyl)porphyrin (TPPS) by trinitrotoluene (TNT). *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2006, 65, 901-906.
172. Yadav S, Ahmad F: A New Method for the Determination of Stability Parameters of Proteins from Their Heat-Induced Denaturation Curves. *Analytical Biochemistry* 2000, 283, 207-213.

173. Markus MA, Hinck AP, Huang S, Draper DE, Torchia DA: High resolution solution structure of ribosomal protein L11-C76, a helical protein with a flexible loop that becomes structured upon binding to RNA. *Nat Struct Mol Biol* 1997, 4, 70-77.
174. 水中金屬及微量元素檢測方法: <http://www.niea.gov.tw/niea/WATER/W31151B.htm>
- 175.MT-2 PDB sum: <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/pdbsum/GetPage.pl?pdbcode=4mt2&template=protein.html&r=wiring&l=1&chain=A>
176. Visser NV, Hink MA, Borst JW, van der Krogt GNM, Visser AJWG: Circular dichroism spectroscopy of fluorescent proteins. *FEBS Letters* 2002, 521, 31-35.
177. Chou K-C: Prediction of Tight Turns and Their Types in Proteins. *Analytical Biochemistry* 2000, 286, 1-16.

